



Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**Estudio del papel de α -Catenina y otras proteínas
de unión a la Actina en la contracción apical de las
células de la Amnioserosa durante el Cierre Dorsal
de *Drosophila melanogaster***

Jaime Jurado Gómez

Madrid, 2016

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

**Estudio del papel de α -Catenina y otras proteínas de unión
a la Actina en la contracción apical de las células de la
Amnioserosa durante el Cierre Dorsal de *Drosophila*
*melanogaster***

Memoria de Tesis doctoral presentada por

Jaime Jurado Gómez

Licenciado en Biología

Para la obtención del título de Doctor en el programa de Doctorado en
Biociencias Moleculares

Trabajo dirigido por

Nicole Gorfinkiel

Centro de Biología Molecular ‘Severo Ochoa’

Madrid, 2016

RESUMEN

Los diferentes cambios en la forma celular que se producen durante los procesos del desarrollo dependen en gran medida de la transmisión de las fuerzas generadas por el citoesqueleto de actomiosina a las membranas celulares. Con el objetivo de analizar la función de α -Catenina como nexo de unión entre el citoesqueleto de Actina y el complejo de adhesión Cadherina-Catenina durante un proceso morfogénico dinámico, estudiamos el requerimiento del dominio C-terminal de α -Catenina en la contracción apical de las células de la *amnioserosa* durante el cierre dorsal de *Drosophila*. Utilizando una serie alélica de α -Catenina con los dominios de unión a Actina y modulación de Vinculina mutados, determinamos el requerimiento esencial de α -Catenina en la región anterior del embrión, afectando a los procesos morfogénicos de involución de la cabeza y del cierre dorsal. Con el análisis cuantitativo del cierre dorsal descubrimos que varios procesos celulares están afectados con independencia de los defectos en la involución de la cabeza. En concreto, se produce un enlentecimiento del cierre dorsal en embriones mutantes para α -Catenina con el dominio C-terminal truncado debido a la generación de defectos tanto en el cable supracelular de actomiosina como en la contracción apical de las células de *amnioserosa*. A través del análisis sub-celular de la dinámica del citoesqueleto de Actina en la región medio-apical revelamos que α -Catenina contribuye a la estabilización y formación de los focos de Actina y de esta manera regula el ciclo de contracción de las células de la *amnioserosa*. Además, α -Catenina tiene la función de estabilizar la molécula E-Cadherina a nivel de las membranas durante el cierre dorsal, sugiriendo que la maquinaria contráctil regula la estabilidad de las uniones adherentes. Por último, debido a que α -Catenina es una proteína multi-dominio capaz de interaccionar con diferentes proteínas, analizamos la localización y función de diferentes proteínas de unión a los filamentos de Actina durante el cierre dorsal. En particular, encontramos que α -Catenina y Vinculina interaccionan genéticamente, que Vinculina puede compensar parcialmente la falta de α -Catenina, y que existe un reclutamiento de Vinculina a la membrana apical dependiente de tensión. En general, nuestros resultados sugieren que Vinculina y α -Catenina forman parte de un complejo mecano-sensible en las células de la *amnioserosa*.

SUMMARY

Cell shape changes during morphogenesis depend to a great extent on forces transmitted from the actomyosin cytoskeleton to cell membranes. We analysed the role of α -Catenin as a physical linker between actin cytoskeleton and Cadherin-Catenin complex during the dynamic process of dorsal closure in *Drosophila*. In particular, we studied the requirement of α -Catenin C-terminal domain during *amnioserosa* apical contraction. We used allelic series for α -Catenin with mutations in either the actin binding domain or the Vinculin modulation domain and determined an essential requirement of α -Catenin in the anterior region of the embryo. This affected the morphogenetic process of head involution and dorsal closure. After quantitative analysis of dorsal closure we found many cellular processes affected, independently of the anterior head defects. Specifically, we found dorsal closure progression delay in α -Catenin mutant embryos with a truncated C-terminal domain. These embryos also developed defects in the actomyosin supracellular cable and in *amnioserosa* cells apical contraction. Sub-cellular analysis of actin cytoskeleton dynamics in the medio-apical region revealed that α -Catenin regulates contraction pulses in *amnioserosa* cells through actin foci formation and stabilization. Besides, α -Catenin showed a role in E-Cadherin stabilization at the level of cell membranes during dorsal closure, suggesting that the actomyosin network machinery regulates adherens junctions stability. α -Catenin is a multi-domain protein with ability to interact with numerous proteins, thus we analysed the localization and function of different actin binding proteins during dorsal closure. In particular, we found a genetic interaction between α -Catenin and Vinculin, in which Vinculin partially rescues α -Catenin function. Furthermore, Vinculin is recruited to apical cell membranes in a tension dependent manner. Taken together, our data suggest the existence of a mechano-sensing complex formed by Vinculin and α -Catenin in *amnioserosa* cells.

INDICE

Clave de Abreviaturas.....	pág. 1
1. INTRODUCCIÓN.....	pág. 3
1.1. Propiedades mecánicas de los tejidos durante la morfogénesis.	
1.2. Cierre dorsal como modelo para el estudio de procesos dinámicos durante el desarrollo.	
1.3. <i>Amnioserosa</i> : especificación y función durante la embriogénesis de <i>Drosophila melanogaster</i> .	
1.3.1. Especificación de la <i>amnioserosa</i> .	
1.3.2. Función de la <i>amnioserosa</i> durante la elongación y retracción de la banda germinal.	
1.3.3. Función de la <i>amnioserosa</i> durante el cierre dorsal.	
1.3.3.1. Contracción apical de las células de la <i>amnioserosa</i> .	
1.3.3.2. Contribución del <i>leading-edge</i> .	
1.3.3.3. Mecanismo de señalización durante el cierre dorsal.	
1.3.4. Evolución de la <i>amnioserosa</i> .	
1.4. Mecanismos que explican el comportamiento oscilatorio del citoesqueleto de actomiosina.	
1.4.1. Origen y significado biológico de las oscilaciones en los sistemas biológicos.	
1.4.2. Papel de la fosforilación de la Miosina en las oscilaciones del citoesqueleto.	
1.4.3. Papel de la dinámica de Actina y el complejo de adhesión Cadherina-Catenina en las oscilaciones del citoesqueleto y en la contracción apical.	
1.5. Estructura y función de la α -Catenina en procesos morfogénéticos.	
1.6. Mecano-sensibilidad del complejo Cadherina-Catenina.	
2. OBJETIVOS.....	pág. 27
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	pág. 29
3.1. Genética de <i>Drosophila melanogaster</i> .	
3.1.1. Cultivos de <i>Drosophila</i> .	
3.1.2. Estirpes de <i>Drosophila</i> .	

3.1.3.	Líneas Recombinantes.	
3.1.4.	Generación de línea transgénica.	
3.1.5.	Generación de clones por recombinación mitótica.	
3.1.6.	Sistema Gal4/UAS.	
3.1.7.	Sistema deGradFP.	
3.1.8.	Cruces Maternal-Gal4/UAS-shRNA.	
3.2.	Preparación de cutículas.	
3.3.	Western Blot.	
3.4.	Diseño y micro-inyección del ARN de doble cadena.	
3.5.	Inmuno-histoquímica.	
3.6.	Medición de los niveles de fluorescencia para α -Catenina.	
3.7.	Preparación de embriones y adquisición de imágenes en microscopio confocal invertido.	
3.8.	Análisis morfométrico de las células de la amnioserosa.	
3.9.	Alineamiento temporal de los embriones.	
3.10.	<i>Fluorescent Recovery After Photobleaching</i> (FRAP).	
3.11.	Ablación por láser.	
3.12.	Análisis estadístico.	
4.	RESULTADOS.....	pág. 44
4.1.	Mutaciones puntuales en los dominios central y C-terminal de α -Catenina resultan en alelos de falta de función.	
4.1.1.	Presentación de los alelos mutantes para los dominios central y C-terminal de α -Catenina.	
4.1.2.	Las formas mutantes de α -Catenina se localizan en la membrana de las células epiteliales de los discos imaginales.	
4.1.3.	Los mutantes de α -Catenina afectan de manera diferencial los niveles de la proteína materna.	
4.1.4.	Los mutantes del dominio de unión a Actina y de modulación a Vinculina de α -Catenina presentan letalidad embrionaria.	
4.2.	Diferentes procesos celulares se ven afectados durante el cierre dorsal en los embriones mutantes para α -Catenina.	

- 4.2.1. Los embriones mutantes para α -Catenina presentan defectos que afectan los procesos del cierre dorsal y de la involución de la cabeza.
- 4.2.2. Los embriones mutantes para los dominios C-terminal y de modulación de Vinculina de α -Catenina presentan una reducción de la velocidad del cierre dorsal.
- 4.2.3. Los embriones mutantes de α -Catenina presentan un mayor número de delaminaciones.
- 4.2.4. La morfología del cable supracelular de actomiosina y el cierre en cremallera están afectados en los embriones mutantes para α -Catenina.
- 4.2.5. Las proteínas truncadas de α -Catenina no interaccionan con el citoesqueleto de actomiosina.
- 4.3. α -Catenina afecta el comportamiento oscilatorio y contráctil de las células de la *amnioserosa* a lo largo del cierre dorsal.
 - 4.3.1. La amplitud y la duración del ciclo de oscilación están incrementados a lo largo del cierre dorsal en los embriones mutantes de α -Catenina.
 - 4.3.2. El incremento de la duración del ciclo de oscilación se debe preferencialmente al incremento en el ciclo de expansión.
 - 4.3.3. Los embriones del dominio C-terminal truncado presentan defectos en el desplazamiento máximo de las membranas celulares.
- 4.4. α -Catenina regula la dinámica de los focos de actina y la estabilización de la ECadherina.
 - 4.4.1. α -Catenina regula la dinámica de los focos de actina en las células de la *amnioserosa*.
 - 4.4.2. Defectos en la tasa de recambio (*turnover*) de E-Cadherina en las membranas de las células de la *amnioserosa* de los mutantes de α -Catenina.
- 4.5. Vinculina es reclutada dependiendo de tensión en la membrana apical de las células de la *amnioserosa* de manera dependiente e independiente de α -Catenina.
 - 4.5.1. Los niveles de Vinculina se incrementa en las membranas de las células de la *amnioserosa* dependiente de tensión.

4.5.2. α -Catenina interacciona genéticamente con Vinculina en el embrión de <i>Drosophila</i> .	
4.6. Mecanismo de regulación de la adhesión y la dinámica del citoesqueleto de actomiosina a través de α -Catenina.	
4.6.1. La proteína α -Catenina es requerida en las uniones adherentes tanto en las células de la <i>amnioserosa</i> como en la epidermis del embrión.	
4.6.2. Antagonismo de la función de α -Catenina y Arp2/3 en las células de la <i>amnioserosa</i> .	
4.7. Estudio de la localización y función de Filamina y α -Actinina durante los procesos morfogénéticos del cierre dorsal y de la invaginación del mesodermo de <i>Drosophila</i> .	
4.7.1. Localización y función de Filamina y α -Actinina en las células de la <i>amnioserosa</i> durante el cierre dorsal de <i>Drosophila</i> .	
4.7.2. Localización y función de Filamina y α -Actinina en las células del surco ventral durante la invaginación del Mesodermo de <i>Drosophila</i> .	
5. DISCUSIÓN.....	pág. 80
5.1. Función y conservación de los dominios de unión a los filamentos de Actina y modulación de Vinculina durante los procesos de morfogénesis.	
5.2. Defectos autónomos en la contracción apical de células de la <i>amnioserosa</i> para los embriones mutantes para α -Catenina.	
5.3. Coordinación entre las células de la <i>amnioserosa</i> durante el cierre dorsal.	
5.4. Interacción de α -Catenina con proteínas que regulan la adhesión.	
5.5. Interacción de α -Catenina con proteínas que regulan la arquitectura del citoesqueleto de actina.	
5.6. Interacción de α -Catenina con otros componentes del citoesqueleto.	
5.7. Relación de α -Catenina con el control del tamaño del tejido.	
6. CONCLUSIONES (CONCLUSIONS).....	pág. 95
7. BIBLIOGRAFÍA.....	pág. 100
8. ANEXOS: Figuras Resultados, Suplementarias y Leyendas.....	pág. 114

Clave de Abreviaturas

AP Antero-Posterior

Brk Brinker

Cno Canoe

Dia Diaphanous

Dpp Decapentaplegic

DV Dorso-Ventral

EMS Metanosulfonato de etilo

Ena Enabled

Flw Flapwing

FRAP Fluorescent Recovery After
Photobleaching

Puc Puckered

Pyd Polichaetoid

Q Glutamina

Sog Short gastrulation

Sqh Spaghetti squash

Tkv Thickveins

V Valina

FRET Fluorescence Resonance Energy
Transfer

GBE Germ Band Extension

GBR Germ Band Retraction

JNK Jun-N-terminal

M Metionina

Mbs Myosin Binding Subunit

ML Medio-Lateral

MLCP Myosin Ligth Chain Phosphatase

MTs Microtúbulos

PIV Particle Image Velocimetry

ROCK Rho-Kinase

ROS Reactive Oxygen Species

Shg Shotgun

VBD Vinculin Binding Domain

VH Dominio Homólogo a Vinculina

Zen Zerknullt

α -Cat α -Catenina

INTRODUCCION

1.1. Propiedades mecánicas de los tejidos durante la morfogénesis.

El término morfogénesis se podría definir como el comportamiento colectivo y dinámico de las células durante el desarrollo embrionario y que genera la forma tri-dimensional del organismo. La generación de la forma del embrión comienza con las divisiones celulares que tienen lugar nada más producirse la fecundación y continúa con la formación de los tejidos y su remodelación de manera constante y progresiva durante el desarrollo. Gracias a los importantes avances en genómica y biología molecular se ha llegado a descubrir cómo para el control y desarrollo de los diferentes procesos morfogenéticos están implicados de manera específica determinados genes, morfógenos y moléculas señalizadoras. Sin embargo, todavía no se conoce con precisión cómo estas señales químicas dirigen la formación de los tejidos y órganos de un modo determinado y con unas propiedades físicas únicas. Por tal motivo, uno de los aspectos más interesantes reside en dilucidar cómo las propias células son capaces de generar distintos tipos de fuerzas a través de procesos activos que ocurren en su interior dando lugar a una variedad de comportamientos celulares, y cómo se coordinan en los tejidos para generar los movimientos y deformaciones propios de cada tejido y órgano. En este sentido, ha sido muy importante el trabajo multidisciplinar realizado en los últimos años por parte de físicos, ingenieros y biólogos, describiendo las diferentes fuerzas mecánicas que intervienen durante la morfogénesis (Ingber, 2006, Mammoto and Ingber, 2010, Grill, 2011, Gorfinkiel and Blanchard, 2011, Gorfinkiel, 2016).

1.2. Cierre dorsal como modelo para el estudio de procesos dinámicos durante el desarrollo.

El cierre dorsal es un proceso morfogenético que tiene lugar durante los estadios 12 y 13 de la embriogénesis de *Drosophila*. Durante las 3 horas que dura aproximadamente el proceso, la epidermis lateral situada a ambos lados del embrión se extiende dorsalmente hasta recubrir la discontinuidad epitelial ocupada por la *amnioserosa*, y que queda expuesta tras la retracción de la banda germinal, para finalmente encontrarse en la línea media (Martínez-Arias, 1993). Gracias al uso de la microscopía

confocal junto con la existencia de marcadores fluorescentes de proteínas del citoesqueleto permitieron examinar *in vivo* la dinámica de los diferentes procesos celulares que se producen durante el cierre (Edwards et al., 1997), revelándose como un modelo idóneo para el estudio de la morfogénesis. En concreto, el cierre dorsal es un modelo de gran interés para el estudio de la interacción entre la regulación genética y los procesos mecánicos. En primer lugar, se descubrió que la Miosina-II no muscular (en adelante Miosina) es una molécula esencial en la consecución del cierre dorsal y otros procesos morfogenéticos, estableciéndose el primer nexo de unión entre los motores moleculares y los procesos fundamentales de generación de la forma durante el desarrollo (Young et al., 1993). A continuación, experimentos de ablación por láser confirmaron la existencia de **múltiples fuerzas** contribuyendo al cierre dorsal. Por un lado, las células de la *amnioserosa* y el *leading-edge*, formado por las células más dorsales de la epidermis lateral y en contacto con la *amnioserosa*, producen una fuerza que favorece la consecución del cierre. En cambio, la tensión generada en la epidermis lateral, cuyas células se elongan perpendicularmente al eje antero-posterior del embrión, se opone al cierre al retrasar el avance del *leading-edge* (Kiehart et al., 2000).

De manera complementaria, el cierre dorsal también se ha utilizado como modelo de estudio del cierre epitelial de heridas (Belacortu and Paricio, 2011). Asimismo, existen similitudes entre el cierre dorsal y diversos eventos de fusión epitelial durante el desarrollo de vertebrados, en los que dos tejidos se aproximan y acaban fusionándose para cerrar una discontinuidad, tales como el cierre del tubo neural, paladar y corazón (Ray and Niswander, 2012).

1.3. *Amnioserosa*: especificación y función durante la embriogénesis de *Drosophila melanogaster*.

La *amnioserosa* es un **tejido extraembrionario** altamente dinámico que sufre diversos cambios dramáticos tanto en la forma del mismo como en el conjunto de células que contiene. Dichos cambios se producen a lo largo de diferentes estadios del desarrollo embrionario, una vez se ha especificado, resultando esencial para la viabilidad del embrión de *Drosophila* y de otros insectos (**Fig. I1**).

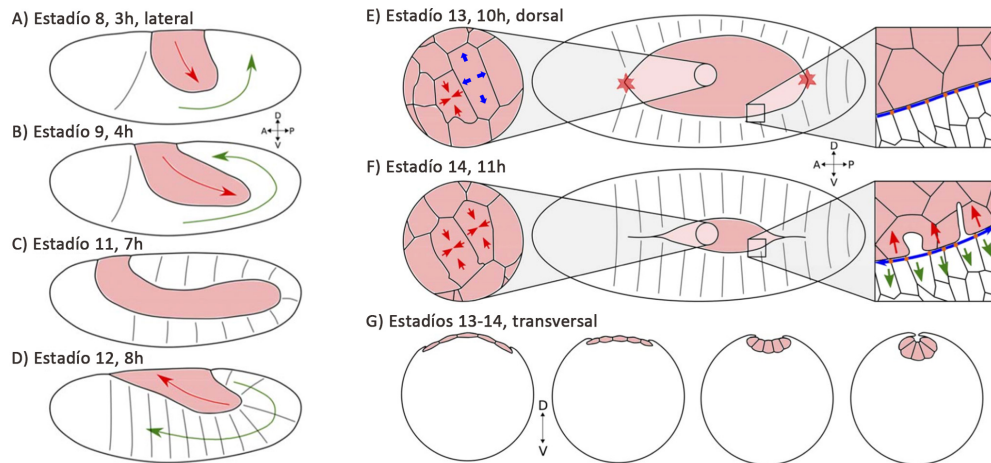


Figura 11. Resumen de los procesos de GBE, GBR y Cierre Dorsal de *Drosophila*. La *amnioserosa* está coloreada en rosa. (A= Anterior, P=Posterior, D=Dorsal, V=Ventral). (A-D) Procesos de GBE y GBR en visión lateral. Las flechas rojas y verdes señalan la dirección del movimiento de la *amnioserosa* y la banda germinal, respectivamente. (E-F) Cierre dorsal en su visión dorsal. Los cantos están marcados con estrellas rojas. Los círculos marcan las células de la *amnioserosa* desarrollando el comportamiento pulsátil asincrónico de la fase temprana (las flechas rojas y azules muestran la contracción y la expansión, respectivamente); los rectángulos marcan la interfase entre la *amnioserosa* y la epidermis lateral. El cable supra-celular de actomiosina (azul) y las uniones adherentes (naranja) a lo largo del *leading-edge*. (F) Los lamelipodios (izquierda) y filopodios (derecha) proyectados desde las células de la epidermis lateral. Las flechas representan las fuerzas de la *amnioserosa* (rojo), el cable de actomiosina (azul) y la epidermis lateral (verde). (G) Visión transversal del cierre dorsal donde se aprecia el cambio de forma de las células de la *amnioserosa* durante proceso (modificado de Lacy y Hutson, 2016).

1.3.1. Especificación de la *amnioserosa*.

La *amnioserosa* contiene aproximadamente 200 células que se especifican entre las 6000 células que se forman durante el proceso de celularización del blastodermo sincitial de *Drosophila* (Mazumdar and Mazumdar, 2002, Harris et al., 2009, Figard et al., 2013). Previamente a la celularización, los gradientes de las proteínas codificadas por los morfógenos *dorsal* y *decapentaplegic* (Dpp) definirán el patrón de expresión del factor de transcripción *zerknüllt* (Zen), que determinará finalmente la extensión de la *amnioserosa* a lo largo de la región dorsal del embrión (Rushlow et al., 2001, Schmidt-Ott et al., 2010). Durante las 13 divisiones sincrónicas que tienen lugar antes de la

celularización, la distribución de Dorsal es muy dinámica. En un comienzo, Dorsal se localiza homogéneamente en el espacio vitelino. Posteriormente, se internaliza en los núcleos que migran a la periferia del embrión, bajo el control de la vía de señalización del receptor Toll (Haskel-Ittah et al., 2012). Una vez se ha completado el proceso de celularización, Dorsal se localiza mayoritariamente en los núcleos situados en la región ventral del embrión, promoviendo la localización en dicha zona de la proteína *Short gastrulation* (Sog). Ésta a su vez, regula negativamente la expresión de Dpp que queda restringida a la región más dorsal del embrión (Huang et al., 1993). A continuación, la proteína Zen, que se localiza inicialmente en la región dorsal por ser antagonista con la localización ventral de Dorsal, se hace más específica de manera coordinada con la localización de Dpp definiendo la especificación de la futura *amnioserosa*.

1.3.2. Función de la *amnioserosa* durante la elongación y retracción de la banda germinal.

Una vez transcurrido el proceso de gastrulación, se produce la **elongación de la banda germinal** (*germ band elongation*, GBE) entre los estadios 7-9 de la embriogénesis de *Drosophila*. En dicho evento morfogénico, las células de la epidermis se van intercalando unas con otras produciendo la elongación del tejido desde la regiones lateral y posterior del embrión hasta cubrirlo dorsalmente. Las células de la *amnioserosa*, que quedarán por debajo de la banda germinal finalmente, también se elongan durante este proceso. Sin embargo, la elongación que sufren es mucho más dramática y se produce por el movimiento activo de los haces de microtúbulos (MTs) y la redistribución de las uniones adherentes y del citoesqueleto de actomiosina (Harris et al., 2009).

A continuación, comienza la **retracción de la banda germinal** (*germ band retraction*, GBR) entre los estadios 11-12 del desarrollo. Para este proceso morfogénico, las células de la epidermis se retraen de manera activa y, no des-intercalándose, sino a través de procesos de remodelación de la forma celular consiguiendo la elongación paralela al eje del segmento embrionario que las contiene. En este momento, las células de la *amnioserosa* juegan un papel muy importante asistiendo de manera coordinada la retracción de la banda germinal. Por un lado, al comienzo de la

retracción las células de la *amnioserosa* más posteriores al eje del embrión proyectan lamelipodios hacia la región caudal de la banda germinal generando fuerzas dependientes de Integrinas y Laminina que favorecen la retracción (Schöck and Perrimon, 2002). Por otro lado, en torno a la mitad del proceso, determinados segmentos de la banda germinal están sometidos a una tensión anisotrópica, donde las mayores tensiones son generadas por la contracción de las células de la *amnioserosa* en contacto con dicha región (Lynch et al., 2013).

1.3.3. Función de la *amnioserosa* durante el cierre dorsal.

1.3.3.1. Contracción apical de las células de la *amnioserosa*.

Durante el cierre dorsal la *amnioserosa* reduce progresivamente su superficie a través de la contracción apical de sus células, produciendo una de las mayores fuerzas que contribuyen al cierre (Kiehart et al., 2000, Gorfinkiel and Martínez-Arias, 2007). Una de las particularidades del mecanismo de contracción apical de las células de la *amnioserosa* reside en su naturaleza **oscilatoria**, alternando ciclos de contracción con ciclos de expansión (Solon et al., 2009, David et al., 2010, Blanchard et al., 2010). Dichos ciclos correlacionan con la actividad transitoria de **focos de Actina y Miosina** que recorren la superficie apical de las células. El comienzo de dicha actividad se observa en las células de la *amnioserosa* a partir de los estadios finales en que la banda germinal se retrae, y aumenta de manera progresiva a lo largo del proceso del cierre (David et al., 2010; Blanchard et al., 2010). Este mecanismo de contracción dirigido por la actividad oscilatoria del citoesqueleto de actomiosina está **conservado** en otros tejidos durante la morfogénesis. Tal es el caso del proceso de invaginación del mesodermo o la oscilación en la forma de las células de la epidermis durante la elongación de la banda germinal en *Drosophila* (Martin et al., 2009, Fernandez-Gonzalez and Zallen, 2011). Por otro lado, las oscilaciones del citoesqueleto no son exclusivas del plano apical, ya que las células del epitelio folicular de *Drosophila* también desarrollan un comportamiento oscilatorio del citoesqueleto de actomiosina en su superficie basal (He et al., 2010, Valencia-Exposito et al., 2016).

Además, se ha propuesto la existencia de un **ratchet** o trinquete como mecanismo estabilizador del comportamiento oscilatorio, dando lugar a la contracción neta de las

células y del tejido (**Fig. 12**). La utilización de dicho símil mecánico como mecanismo estabilizador de las oscilaciones consiste en que permite a un engranaje avanzar en un sentido, pero le impide hacerlo en el contrario, como el freno de mano de un coche. Asimismo, se han descrito dos posibles escenarios para explicar el origen del mecanismo. Por un lado, se ha propuesto la existencia de un *ratchet* extracelular originado por la contracción del cable supracelular de Actina, localizado en la interfase entre la epidermis y la *amnioserosa*, y que impediría la relajación de las células de la *amnioserosa* después del ciclo de contracción (Solon et al., 2009). Por otro lado, se ha propuesto la existencia de un *ratchet* intracelular, originado por el enriquecimiento progresivo de la red apical de actomiosina (Martin et al., 2009, Blanchard et al., 2010). Aunque, probablemente, ambos mecanismos actúen de manera coordinada, un análisis teórico predice que el *ratchet* intracelular tiene una mayor aportación en la contracción neta de las células de la *amnioserosa*, ya que la reducción del área del tejido era muy similar con o sin el cable supracelular de Actina (Wang et al., 2012b).

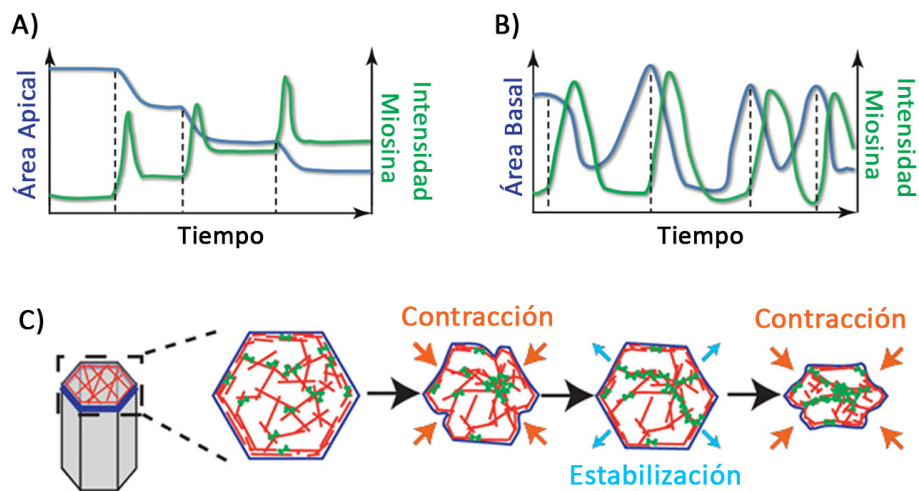


Figura 12. Ciclo oscilación durante la contracción apical y basal de células epiteliales y mecanismo de ratchet. (A) Gráfico representativo de la intensidad de Miosina medial (línea verde) y del área celular apical (línea azul) según se observa durante la invaginación del mesodermo de *Drosophila*. (B) Gráfico representativo de los pulsos de Miosina y las oscilaciones del área sin estabilización, según la región basal del epitelio folicular de *Drosophila*. (C) Modelo de *ratchet* para la contracción apical. La Miosina (verde) contrae la red apical de Actina (rojo) que está acoplada a las uniones

adherentes (azul) dirigiendo la contracción. Los pulsos de relajación son interrumpidos por una fase en la que el estado contraído de la célula se estabiliza. Dicho modelo podría aplicarse tanto para las células del surco ventral del futuro mesodermo y las células de la *amnioserosa* (modificado de Martin et al., 2009; Levayer y Lecuit, 2012).

Alternativamente, se han descrito otros mecanismos por los cuales las células de la *amnioserosa* cambian su forma y por ende contribuyen a la consecución del cierre dorsal. Por un lado, el mecanismo de apoptosis que se produce tempranamente para algunas células de la *amnioserosa*, en las cuales se incrementan los niveles de las ROS (*Reactive Oxygen Species*) produciendo la fragmentación mitocondrial que activa la cascada apoptótica. Como resultado, las células de la *amnioserosa* se delaminan por su plano basal. Sin embargo, dicho proceso contribuye como mucho en un tercio respecto al total de la fuerza necesaria para la consecución del cierre (Toyama et al., 2008, Muliyl et al., 2011, Muliyl and Narasimha, 2014). Por otro lado, se ha propuesto el mecanismo de reducción gradual del volumen celular y de manera generalizada a través de la pérdida del agua del interior de las células de la *amnioserosa*, dependiente de los canales que regulan el intercambio extracelular de iones K⁺. Sin embargo, dicho mecanismo se produciría una vez iniciado el proceso de contracción neta en las células de la *amnioserosa* (Saia et al., 2015). Es probable que todos estos procesos celulares: contracción apical, delaminación apoptótica y reducción de volumen, contribuyen a generar la fuerza contráctil de la *amnioserosa* proveyendo robustez al proceso.

Por último, otra cuestión reside en el mecanismo que regula el reciclado de la membrana en las células de la *amnioserosa* durante el proceso del cierre dorsal. Para ello se ha propuesto un mecanismo dirigido por la maquinaria endocítica de las proteínas Rab GTPasas. En concreto la proteína Rab5 es requerida para remover la membrana durante el proceso de contracción apical, mientras que la proteína Rab11 exhibe el efecto opuesto, siendo requerida para el incremento de la superficie apical en los estadios tempranos (Mateus et al., 2011). En este mismo sentido, las células de la *amnioserosa* forman proyecciones de membrana o filopodios en las región apical, cuya dinámica es regulada por la proteína Diaphanous, promoviendo una mayor estabilidad que los generados en las células epidérmicas (Nowotarski et al., 2014). Una de las hipótesis que explica la función de los filopodios en la *amnioserosa* sería la de actuar como reservorios de membrana ante la rápida reducción del área apical de las

células, como ocurre durante la celularización del blastodermo de *Drosophila* (Figard et al., 2013). Otra opción sería la de actuar como *citonemas*, que son filopodios especializados en la actividad señalizadora célula-célula en diferentes tejidos como el disco imaginal de ala de *Drosophila* (Bischoff et al., 2013).

1.3.3.2. Contribución del *leading-edge*.

En cuanto al conjunto de células de la epidermis más dorsal en contacto directo con la *amnioserosa* y que forman el *leading-edge*, contribuyen de manera activa en el sellado de la discontinuidad dorsal a través de diferentes mecanismos, que incluyen la formación y la contracción del cable supracelular de Actina y Miosina (Jacinto et al., 2002) y el cierre en cremallera (*zippering*) que ayuda a sellar ambos flancos de la epidermis (Jacinto et al., 2000, Hutson et al., 2003). Además, según progresa el cierre dorsal, las células de la epidermis lateral se elongan en la dirección Dorso-Ventral (DV) para ajustarse al incremento de la superficie requerida para cubrir la *amnioserosa* (Kiehart et al., 2000).

En la interfase entre la epidermis y la *amnioserosa* se forma el **cable supracelular** de Actina y Miosina, formado por el frente de células de la epidermis más dorsal y también por las células periféricas de la *amnioserosa* (Wada et al., 2007). Como característica morfológica, la localización de la Miosina se produce en puntos a lo largo del cable alternando con otras proteínas, mientras que la distribución de Actina es más dinámica aunque también tiende a acumularse en puntos al nivel de las uniones adherentes entre las células epidérmicas (Kaltschmidt et al., 2002). La Miosina y la Actina forman un cable supracelular contráctil que se distribuye de manera continua alrededor de la *amnioserosa* y que actúa a modo de *purse-string*, y cuya integridad requiere de una fuerte adhesión intercelular (Kiehart et al., 2000). De hecho, embriones mutantes para la quinasa Jun-N-terminal (JNK) muestran un cierre dorsal defectuoso al verse comprometida la adhesión célula-célula que tiene lugar desde el plano basolateral de las células más periféricas de la *amnioserosa* con las células de la epidermis más dorsal del *leading-edge* (Wada et al., 2007). Además, la interacción de JNK con la GTPasa Rac1 regula el reclutamiento de los componentes del citoesqueleto en el *leading-edge* (Ricos et al., 1999). Respecto a la fuerza del cable, estudios de

ablación por láser han demostrado que el cable supracelular genera una fuerza contráctil, cuya curvatura es el resultado de las diferentes fuerzas originadas en la epidermis y la *amnioserosa* produciendo una fuerza neta y única que se dirige dorsalmente (Kiehart et al., 2000, Hutson et al., 2003, Peralta et al., 2007).

En lo que respecta al **cierre en cremallera**, los mismos experimentos de ablación por láser han determinado que no es estrictamente necesario para la progresión del cierre, pero sí tiene un efecto en la tensión generada en el cable ya que afecta a la curvatura del mismo. El cierre en cremallera consiste en el interdigitado de filopodios formados por las células epidérmicas más dorsales que se extienden a lo largo del frente de avance de la epidermis lateral, dando lugar a un cierre de tipo cremallera durante la fase final del cierre dorsal. El proceso comienza en ambos cantos o extremos de la *amnioserosa* y progresa hacia la línea media quedando los segmentos del embrión perfectamente sellados y alineados una vez finalizado el cierre (Jacinto *et al.*, 2000). En una situación experimental en la que se compromete el número y la longitud de los filopodios alterando la función de Enabled, que regula la elongación de los filamentos de Actina, el proceso del cierre en cremallera se enlentece (Gates et al., 2007). No obstante, la dificultad de alterar la función de los reguladores de Actina de manera específica en los filopodios sin alterar el resto de estructuras hace difícil determinar su relevancia y función en el proceso de cierre dorsal (Nowotarski et al., 2014). Además, los microtúbulos resultan de vital importancia para los procesos relacionados con el cable, tanto para la distribución espacial de la Actina y la Miosina como para la formación de los filopodios. Sin embargo, no resultan esenciales para el resto de procesos que ocurren durante el cierre (Jankovics and Brunner, 2006).

A pesar de la importancia que tienen tanto el cierre en cremallera como la tensión generada por el cable de actomiosina para producir un cierre normal, ambos procesos podrían no resultar necesarios estrictamente. Experimentos de ablación por láser que consisten en cortar de manera simultánea y continuada ambos extremos del cierre producen una reducción de la tensión generada en el cable que no resulta en ningún defecto en la velocidad de contracción de las células de la *amnioserosa* las cuales son capaces de completar la fusión del tejido de manera **autónoma** (Wells et al., 2014).

1.3.3.4. Mecanismos de señalización durante el cierre dorsal.

Ante la diversidad de procesos descritos durante el cierre dorsal resulta necesario mantener la **coordinación** entre la epidermis y la *amnioserosa*. Para lo cual es importante el mecanismo de señalización mediado por la quinasa JNK y que dirige la expresión en las células de la epidermis que forman el *leading-edge* del morfógeno Dpp, miembro de la familia de BMP/TGF- β en *Drosophila*. Por un lado, los mutantes zigóticos para el receptor de Dpp, *thickveins* (*tkv*) exhiben defectos en el cierre dorsal, con defectos tanto en la elongación de las células más dorsales de la epidermis como en la formación del cable de actomiosina y en el proceso del cierre en cremallera (Riesgo-Escovar and Hafen, 1997, Fernandez et al., 2007). Si bien se ha postulado que la expresión temprana de Dpp en las células de la epidermis más dorsal se requiere para la contracción de la *amnioserosa* (Fernandez et al., 2007, Wada et al., 2007), los embriones mutantes para *tkv* mantienen una evolución en la forma de las células de la *amnioserosa* a lo largo del cierre de manera similar a la de embriones silvestre, sugiriendo que la tensión generada apicalmente se mantiene y los embriones terminan por cerrarse (Blanchard et al., 2010).

La amplia diversidad y riqueza de estudios que tratan de explicar los diferentes mecanismos descritos anteriormente para la epidermis y la *amnioserosa* definen el cierre dorsal como un proceso morfogenético complejo y altamente **robusto**, el cual resulta vital para el desarrollo normal del embrión de *Drosophila*. En general, la robustez es una característica intrínseca de los procesos morfogenéticos porque la naturaleza ha seleccionado varios mecanismos para asegurar una estabilidad fenotípica ante las variabilidades ambientales y genéticas. Recientemente, se ha descrito para el cierre dorsal el un mecanismo de señalización basado en el complejo de retroalimentación formado por Dpp/Brk y JNK, mostrando cómo Dpp es capaz de filtrar un exceso de JNK, a través de la activación del efector Brinker (Brk) que reprime la función de DPP manteniendo la identidad de células epidérmicas del *leading-edge* en condiciones de un aumento ligero en la expresión de JNK (Ducuing et al., 2015). De esta manera, comparando embriones mutantes de falta de función del gen *puckered* (*puc*), la fosfatasa de JNK, donde se produce una actividad ectópica de JNK (Martin-Blanco et al., 1998) , con embriones mutante-doble para *brk* y *puc* se observa que en

los últimos hay un aumento en el número de células de la epidermis lateral que se diferencian en células del leading-edge, caracterizadas por la formación de uniones adherentes más fuertes, mayor densidad de MTs y la formación del cable supracelular de actomiosina. Por último, en condiciones más extremas generadas por un aumento en la temperatura del medio externo (32°C), utilizado como ensayo clásico de la robustez en *Drosophila* (Perry et al., 2010), Brk también tiene la función de prevenir un aumento del número de células con características similares a las del *leading-edge* en la epidermis lateral y produciéndose un enlentecimiento del cierre dorsal. Mientras que a una temperatura normal (25°C) no se requiere la actividad de Brk para la consecución del cierre (Ducuing et al., 2015).

1.3.4. Evolución de la *amnioserosa*.

A pesar de la importancia que tiene la *amnioserosa* durante la embriogénesis de *Drosophila* tanto para la elongación y retracción de la banda germinal como para el proceso del cierre dorsal, todos estos estadios morfogenéticos son comunes entre los insectos, pero no así la *amnioserosa* como única estructura. La mayoría de los órdenes de insectos tienen en su lugar dos tejidos extraembrionarios, el *amnion* y la *serosa*, que se separan tempranamente en el desarrollo. Particularmente, en los embriones de la mosca del género *Megaselia*, el *amnion* permanece contiguo a la epidermis embrionaria, mientras que la *serosa* va recubriendo externamente al embrión durante los procesos de elongación y retracción de la banda germinal. Una vez comenzado el cierre dorsal, la *serosa* se rompe y se retrae hasta la región dorsal para luego invaginarse junto al *amnion* en un proceso muy similar al que sufre la *amnioserosa* durante el cierre dorsal de *Drosophila* (Wotton et al., 2014).

El origen de una única *amnioserosa* ocurrió de manera exclusiva en *Drosophila* entre 80 y 145 millones de años atrás (Panfilio, 2008, Rafiqi et al., 2008). Además, el gen *zen* estaría fuertemente implicado en el origen evolutivo de la *amnioserosa*, pero en *Drosophila* su expresión está regulada temporalmente como se mencionó con anterioridad, mientras que en otros insectos está regulado de manera diferente según el tejido extraembrionario. El *amnion* no tendría expresión alguna mientras que la *serosa* tendría una expresión positiva del gen *zen* (Rafiqi et al., 2010).

1.4. Mecanismos que explican el comportamiento oscilatorio del citoesqueleto de actomiosina.

1.4.1. Origen y significado biológico de las oscilaciones en los sistemas biológicos.

El comportamiento oscilatorio está presente en multitud de procesos celulares. Se han observado oscilaciones en la expresión de determinados genes, en la fosforilación de ciertas proteínas y en la actividad del citoesqueleto, entre otros (Kruse and Julicher, 2005). En particular, los sistemas biológicos actúan como **osciladores no-lineales** abiertos, con un flujo constante de energía a través del sistema. Tales osciladores tienen la habilidad de generar oscilaciones en una variable o parámetro determinados de manera espontánea, y se caracterizan por cambiar dicho parámetro a lo largo del tiempo de **manera periódica** y con una **amplitud** máxima (Dierkes et al., 2014, Gorfinkiel, 2016).

En el caso particular de las oscilaciones del citoesqueleto, su actividad reside en la capacidad de los **motores moleculares** para convertir la energía química en energía mecánica. Tal es el caso del movimiento de los axonemas dentro de los cilios, formados por haces de microtúbulos sobre los que se deslizan motores de Dineína, o las oscilaciones en los sarcómeros que forman los músculos del vuelo en algunos insectos (Kruse and Julicher, 2005). En experimentos *in vitro* que consisten en la utilización de pinzas ópticas capaces de atrapar un único filamento de Actina que interacciona a su vez con varios motores de Miosina, se ha observado la aparición de oscilaciones en el sistema. Estas observaciones han llevado a sugerir que el comportamiento oscilatorio del citoesqueleto sujeto a una carga elástica se produciría de manera espontánea (Placais et al., 2009). Por ello se podría especular que las fluctuaciones observadas en el área apical de las células de la *amnioserosa* y en otros sistemas sean consecuencia de las propiedades auto-oscilatorias que tienen las redes contráctiles. Se ha propuesto que las oscilaciones en las células de la *amnioserosa* aparecen por la tensión ejercida por las células vecinas (Solon et al., 2009). Sin embargo, el aislamiento mecánico de una célula de la *amnioserosa* de sus vecinas durante su ciclo de expansión, aplicando múltiples ablaciones con un láser de UV en la escala de duración de los nanosegundos, no mostró un colapso en la célula, que sería

generado por la tensión de las vecinas sino un tiempo de pausa de hasta 40 segundos (Jayasinghe et al., 2011). Estos resultados apoyan la idea de que las oscilaciones en las células de la amnioserosa son autónomo-celulares, y por lo tanto podría surgir de la actividad espontánea del citoesqueleto.

Diferentes **modelos teóricos** que tratan de explicar la aparición de las oscilaciones en el citoesqueleto y en la forma celular han propuesto esencialmente un sistema mecano-químico, donde la mecánica tiene un papel a diferentes niveles del sistema. Uno de los primeros modelos describió la formación de oscilaciones de actomiosina sin la necesidad de ninguna molécula reguladora que encienda o apague la actividad de la Miosina. Dicho modelo explica cómo un conjunto de motores puede generar oscilaciones cuando trabajan contra una carga elástica a través de un mecanismo de retroalimentación positiva asociado con la disociación de la Miosina de la Actina dependiente de la carga (Julicher and Prost, 1995). Recientemente, se ha propuesto un modelo que explica la actividad autónomo-celular de las oscilaciones en la región basal del epitelio folicular y que reside en el equilibrio entre la cantidad de filamentos de Actina y de motores de Miosina que interaccionan entre sí. En un comienzo se produciría un aumento progresivo de los filamentos de Actina favorecido por la asociación con los mini-filamentos de Miosina. Seguidamente, el aumento de tensión producido por un incremento en el número de motores de Miosina favorecería la disociación de los filamentos de Actina (Valencia-Exposito et al., 2016). Otros modelos contemplan además el contexto de las oscilaciones dentro de un epitelio, proponiendo que las oscilaciones surgen debido al acoplamiento entre la tasa de recambio de la actomiosina y la deformación de la célula dirigida por la Miosina (Machado et al., 2014, Dierkes et al., 2014). Por otro lado, otros modelos han propuesto la existencia de una molécula oscilatoria que regula la actividad de la Miosina también en un contexto de cierre dorsal, donde se establece un mecanismo de retroalimentación entre la actividad de la molécula reguladora junto con la tasa de degradación de la miosina (Wang et al., 2012a). En concreto, se ha propuesto un modelo en que la molécula Rho GTPasa actuaría como regulador de la actividad de la Miosina en el epitelio folicular del ovario de *Drosophila* (Koride et al., 2014).

Asimismo, es importante analizar el **significado biológico** que pueden tener las oscilaciones en el citoesqueleto durante el desarrollo. Se ha propuesto que las oscilaciones en la actividad del citoesqueleto de actomiosina podrían permitir a las células adaptarse a los cambios del medio ambiente para cambiar la forma e incluso diferenciarse a un destino celular diferente, pudiendo adaptar los contactos celulares o acoplar nuevos motores. En segundo lugar, la alternancia entre dos estados permite adaptar diferentes funciones celulares, como generar cambios en el tejido y a la misma vez mantener las propiedades mecánicas necesarias. Por último, la existencia de estadios intermedios permite la vuelta a un estado previo en caso de que algo pueda llegar a fallar (Kruse and Riveline, 2011).

1.4.2. Papel de la fosforilación de la Miosina en las oscilaciones del citoesqueleto.

A lo largo del cierre dorsal las oscilaciones en el área apical de las células de la *amnioserosa* varían en su frecuencia y amplitud, lo que sugiere el requerimiento por parte de otras moléculas para su regulación. En este sentido, el mecanismo de fosforilación de la Miosina llevada a cabo por la actividad reguladora de quinasas y fosfatasas es muy importante y está conservado en diferentes tejidos. En particular, en las células ventrales del embrión de *Drosophila* que se invaginan durante la gastrulación, se pierde la localización de la Miosina cuando se inhibe la función de Rok (*Rho-associated protein kinase*). Incluso, a través del uso de formas fosfomiméticas y no fosforirables de la cadena reguladora de la Miosina (*spaghetti squash*) se afecta la dinámica del ensamblaje y desensamblaje de los focos de actomiosina (Mason et al., 2013, Vasquez et al., 2014). De manera similar sucede durante el fenómeno de intercalación de las células epidérmicas durante la elongación de la banda germinal y durante la oscilación basal de las células del epitelio folicular de *Drosophila* (He et al., 2014, Munjal et al., 2015, Valencia-Exposito et al., 2016). En concreto, se ha identificado el papel del gen *flapwing* (*flw*) que codifica para la unidad catalítica de la fosfatasa de la cadena ligera de la Miosina, como regulador en el comienzo y en la periodicidad de las oscilaciones basales del citoesqueleto de actomiosina que ocurren en el epitelio folicular (Valencia-Exposito et al., 2016).

Recientemente, se ha descrito el mecanismo que origina la actividad pulsátil del citoesqueleto de actomiosina durante los procesos de morfogénesis, la cual depende del estado de auto-organización de la red de actomiosina y de la actividad reguladora de Rho1 a través de Rok y Mbs (*Myosin Binding Subunit*), la unidad específica de sustrato de la fosfatasa de la Miosina (Munjal et al., 2015). De esta manera el movimiento de la Miosina a lo largo de los filamentos de Actina promovería el reclutamiento de más Miosina y de sus reguladores, en un proceso definido como advección, propiedad que también explicaría el transporte de la humedad en la atmósfera por efecto del viento, como ejemplo. Sin embargo, el aumento progresivo de la maquinaria contráctil acabaría produciendo la disociación de la red de actomiosina, explicando así el comportamiento oscilatorio. Estos resultados muestran que las oscilaciones de Rho no son independientes a las del resto de la red contráctil, proponiendo que las oscilaciones de actomiosina son una propiedad emergente en las células (**Fig. I3**).

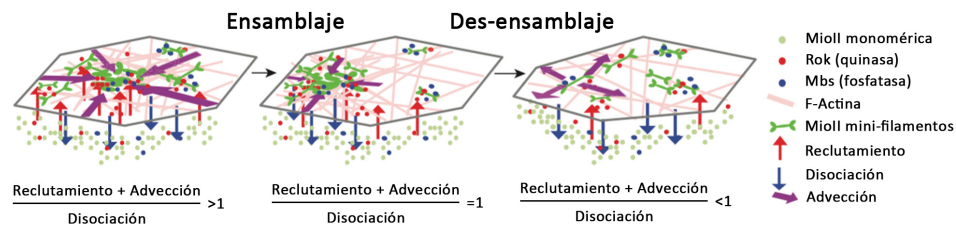


Figura I3. Modelo que explica el mecanismo que origina la actividad pulsátil del citoesqueleto de actomiosina durante los procesos de morfogénesis, a través del balance entre el reclutamiento y advección del citoesqueleto de actomiosina y sus reguladores y la disociación de la red por el aumento progresivo de la actividad contráctil (Modificado de Munjal et al., 2015).

En la *amnioserosa*, se ha propuesto que RhoGEF2, un regulador de la actividad de Rho, regula la localización apical de la Miosina y las oscilaciones de actomiosina (Azevedo et al., 2011). De manera complementaria, un trabajo recientemente publicado en el laboratorio ha descrito cómo la dinámica de los focos de las células de la *amnioserosa* está modulada según los niveles de Miosina fosforilada, a través de la actividad de la fosfatasa (MLCP) y la quinasa (ROCK) de la miosina (Duque y Gorfinkiel, 2016, enviado). Por otro lado, también existe una modulación de los focos por parte de las proteínas

del complejo PAR. Una vez que se activa el ensamblaje de la red contráctil, la proteína Bazooka (Par-3) estaría implicada en prolongar la duración del foco. Con el desensamblaje de la red, Par-6/aPKC inhibirían el ensamblaje de un nuevo foco, promoviendo un mayor tiempo de reposo entre foco y foco (David et al., 2010).

1.4.3. Papel de la dinámica de Actina y el complejo de adhesión Cadherina-Catenina en las oscilaciones del citoesqueleto y en la contracción apical.

Por otro lado, es muy probable que la regulación de las oscilaciones no requiera únicamente de la regulación de la actividad de la Miosina sino también de la regulación de la dinámica de la Actina. De hecho en las células epidérmicas de la banda germinal la formación de los filamentos de Actina precede a la formación del foco de Miosina (Fernandez-Gonzalez and Zallen, 2011), sugiriendo que las redes de Actina pueden formarse de manera independiente a la actividad de la Miosina. El citoesqueleto de Actina es una red altamente dinámica cuya arquitectura depende de la interacción con multitud de proteínas de unión a la Actina (Pak et al., 2008, Michelot and Drubin, 2011, Blanchoin et al., 2014). En concreto, los *cross-linkers* son proteínas que conectan los filamentos entre sí, facilitando por un lado, el desarrollo de la tensión producida por los motores de Miosina (Koenderinka et al., 2009), y por otro, reaccionar de distinta forma a las fuerzas externas. En particular, experimentos de micro-aspiración realizados en la ameba *Dictyostelium discoideum* han revelado como la Filamina, una proteína entre-cruzadora que forma haces de Actina ortogonales, es más sensible al estrés por cizalladura, y que es generado en los tejidos por la acción de fuerzas opuestas. En cambio, la α -Actinina, una proteína entre-cruzadora que genera haces de Actina paralelos, sería más sensible al estrés ocasionado por dilatación en el tejido (Luo et al., 2013). La respuesta diferencial a la deformación se debe a la diferente estructura que adoptan como homo-dímeros, en forma de 'v' para la Filamina o disponiéndose anti-paralelamente para la α -Actinina (Stossel et al., 2001, Djinoić-Carugo et al., 1999) (**Fig. I4**). Incluso, la deformación mecánica puede modular a través del cambio conformacional la interacción de la Filamina con las Integrinas (Ehrlicher et al., 2011). Por lo tanto, es posible que la dinámica y arquitectura del citoesqueleto de Actina esté regulada por tensión, lo que podría de alguna manera contribuir al mecanismo de las oscilaciones.

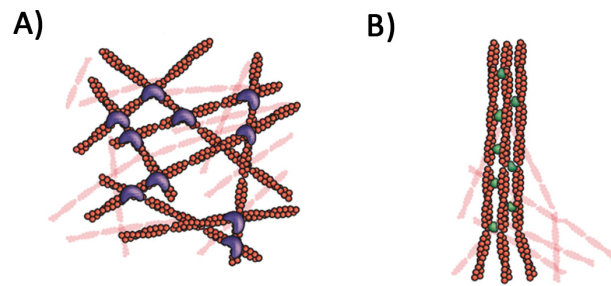


Figura 14. El citoesqueleto de Actina presenta diferente arquitectura según la proteína de unión a Actina con la que interaccione. (A) La unión a Filamina (morado) favorece la formación de haces ortogonales de Actina (rojo). (B) En cambio, la unión a α -Actinina (verde) promueve la formación de haces paralelos (Modificado de Fletcher y Mullins, 2010).

En un contexto de morfogénesis, para generar un cambio en la forma de las células se requiere que las fuerzas contráctiles producidas a nivel de la red de actomiosina se transmitan a las membranas celulares. Experimentos con marcadores fluorescentes usando la técnica de seguimiento de partículas conocida como PIV (*Particle Image Velocimetry*) durante la gastrulación de *C. elegans* y *Drosophila*, han revelado que las redes de actomiosina tienen una actividad dinámica inicial que no conlleva cambios sustanciales en el área apical de las células; posteriormente, la forma de las células cambian debido a la unión dinámica de los contactos célula-célula con la red contráctil pre-existente en la región apical (Roh-Johnson et al., 2012). Estas observaciones llevaron a proponer un mecanismo de **clutch** o embrague para explicar la contracción apical efectiva de las células por la conexión de las membranas a la red contráctil del citoesqueleto de actomiosina (**Fig. 15**).

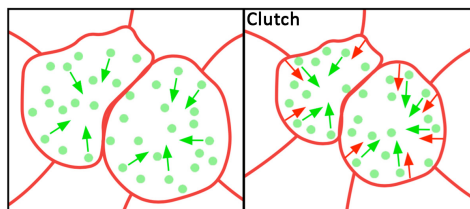


Figura 15. Diagrama simplificado que explica el mecanismo de clutch. Vista de las partículas de Miosina (verde) moviéndose de manera centrípeta hacia el interior de la célula (flechas verdes) sin el acompañamiento de la membrana (rojo) y con el

movimiento de la membrana en la misma dirección (flechas roja) a través del mecanismo de *clutch* (derecha). Modificado de Roh-Johnson et al., 2012.

La unión del citoesqueleto a la membrana, por medio de las uniones adherentes o las adhesiones focales, es por lo tanto fundamental para llevar a cabo los cambios en la forma celular. Además, tanto las uniones adherentes como las adhesiones focales son centros reguladores de interacciones mecano-químicas (Grashoff et al., 2010, Cai et al., 2014). Las adhesiones focales median la unión de las células con la matriz extracelular y una infinidad de estudios han dilucidado cómo estas estructuras subcelulares transmiten información desde el interior de la células hacia la matriz extracelular y viceversa (Thievessen et al., 2013, Koride et al., 2014). En este trabajo sin embargo, nos hemos enfocado en el estudio de la dinámica y función de las uniones adherentes, que median la unión inter-celular en los tejidos epiteliales y por lo tanto son fundamentales para transmitir y coordinar las fuerzas contráctiles generadas localmente a través de todo el tejido.

1.5. Estructura y función de la α -Catenina en procesos morfogenéticos.

La unión adherente está formada por un conjunto de proteínas, Cadherinas y Cateninas, cuya función principal es la **adhesión** intercelular en la región apical. Extracelularmente, la E-Cadherina establece dicha adhesión de una manera directa, a través de la unión homofílica con las cadherinas de las células adyacentes. Dicha unión es dependiente de calcio (Pokutta and Weis, 2007). Intracelularmente, la E-Cadherina se asocia con dos miembros de la familia de las cateninas: β -Catenina/Armadillo y la catenina p120. β -Catenina es requerida para el transporte de E-Cadherina a la membrana y podría tener un papel en regular su endocitosis (Delva and Kowalczyk, 2009, Langevin et al., 2005). La catenina p120 también funcionaría regulando la endocitosis, además de la tasa de recambio de E-Cadherina (Bulgakova and Brown, 2016). α -Catenina, conectaría el citoesqueleto de Actina al complejo de adhesión al unirse directamente a β -Catenina (Rimm et al., 1995). Además, la unión de α -Catenina con los filamentos de Actina puede ser de manera directa así como a través de otras proteínas de unión a la Actina (Roper, 2015) .

Existe un alto grado de **conservación** entre las cateninas de diferentes organismos. En mamífero existen 3 isoformas: α E-Catenina es la mayoritaria en los tejidos epiteliales, α N-Catenina es exclusiva de tejido neural y α T-Catenina se expresa prioritariamente en el corazón (Kobielak and Fuchs, 2004). Mientras que la única isoforma que se expresa en *Drosophila* es aproximadamente un 60% idéntica a la α E-catenina y α N-catenina de vertebrados, en *Caenorhabditis elegans* α -Catenina/HMP-1 comparte un 35-38% de la secuencia de vertebrados. En *Drosophila*, α -Catenina se requiere en diferentes procesos del desarrollo y estructuras del adulto, concretamente durante la embriogénesis temprana, en el epitelio de los discos imaginales, en la retina pupal y en el epitelio folicular (Magie et al., 2002, Cavey et al., 2008, Seppa et al., 2008, Sarpal et al., 2012, Desai et al., 2013, Escobar et al., 2015). También tiene una importante función en otros organismos, donde la falta de función tiene defectos en el desarrollo de vertebrados y de *C. elegans* (Larue et al., 1996, Torres et al., 1997, Costa et al., 1998, Kwiatkowski et al., 2010).

Todas las cateninas presentan 3 **dominios funcionales** llamados dominios homólogos a la Vinculina (VH). El dominio VH1 está situado en la región N-terminal y contiene la región de homo-dimerización y de unión a β -Catenina (Nieset et al., 1997, Pokutta and Weis, 2000). El dominio central o VH2, también llamado fragmento M, puede entrecruzar dímeros de α -Catenina y también unirse a Afadin/Canoe, proteína que recluta a los filamentos de Actina en las uniones adherentes emergentes (Yang et al., 2001, Pokutta et al., 2002). Por último, el dominio C-terminal o VH3 se une directamente a los filamentos de Actina y a ZO-1/Polychaetoid, proteína que también se localiza en la membrana apical e interacciona con los filamentos de Actina (Rimm et al., 1995, Imamura et al., 1999). Otra región de interés corresponde al dominio de unión a Vinculina o VBD (*Vinculin Binding Domain*), localizado entre los dominios VH1 y VH2 (Watabe-Uchida et al., 1998, Weiss et al., 1998). En esta misma región también interaccionaría con α -Actinina (Nieset et al., 1997) (**Fig. I6**). En *Drosophila*, un estudio detallado de los dominios funcionales ha revelado que las regiones de unión a β -Catenina/Armadillo y a los filamentos de actina son esenciales para la integridad de la unión adherente, mientras que la región central, que contiene el dominio VH2 y de unión a Vinculina mejoraría la estabilidad de las uniones (Desai et al., 2013).

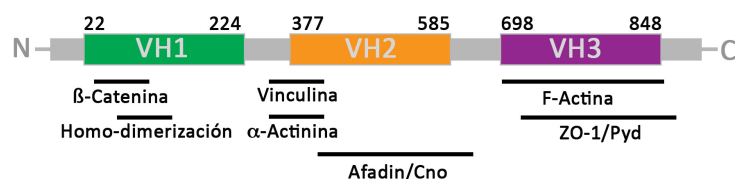


Figura 16. Diagrama que representa los tres dominios con homología a Vinculina (VH) de α E-Catenina y su interacción con diversas proteínas. Se muestran los aminoácidos y los diferentes sitios de unión para varias proteínas propuestas en la literatura que interactúan con α E-Catenina y analizadas en esta tesis doctoral (modificado de Maiden y Hardin, 2011).

Por otro lado, datos obtenidos de estudios bioquímicos y del análisis estructural cristalográfico de la versión humana han revelado que α E-Catenina no puede unirse de manera simultánea a β -Catenina y a los filamentos de Actina (Drees et al., 2005, Yamada et al., 2005). Esto es debido a que el mecanismo por el cual α -Catenina se une a los filamentos de Actina consiste en la formación de una **estructura tridimensional** en el homo-dímero de α -Catenina que consiste en la interacción entre el dominio N-terminal de una de las subunidades que formarían el dímero con el dominio C-terminal de la otra subunidad. Dicha estructura no se formaría cuando α -Catenina estuviera unida a β -Catenina (Rangarajan and Izard, 2013). Estas observaciones han levantado una controversia importante sobre cómo se da entonces la unión del complejo Cadherina-Catenina con el citoesqueleto de Actina.

Sin embargo, en *C. elegans* no se formarían homo-dímeros demostrando que α -Catenina/HMP-1 es un monómero con un dominio C-terminal de unión a los filamentos de Actina funcional (Kwiatkowski et al., 2010). Por otro lado, durante la embriogénesis de *Drosophila*, la α -Catenina **monomérica** actúa como nexo de unión físico y esencial entre el complejo Cadherina-Catenina y el citoesqueleto de Actina, mientras que los homo-dímeros de α -Catenina son citoplasmáticos y forman un equilibrio con la α -Catenina monomérica de las uniones (Desai et al., 2013). Además, se ha propuesto que los homo-dímeros de α -Catenina competirían por los sitios de unión a Actina con el complejo Arp2/3, que promueve la formación de redes de Actina ramificadas y de esta manera promoviendo la formación de haces que normalmente se asocian con las uniones adherentes (Drees et al., 2005, Benjamin et al., 2010, Sarpal et

al., 2012). Sin embargo, los últimos indicios proponen que para tener una adhesión más fuerte se requiere la presencia tanto de la α -Catenina monomérica unida a la membrana como de los homo-dímeros de α -Catenina citosólicos en cultivos celulares (Bianchini et al., 2015).

Por lo tanto, el mecanismo por el cual se realiza la interacción entre el complejo de adhesión Cadherina-Catenina y los filamentos de Actina podría estar regulado por la estructura tridimensional necesaria para la unión a los filamentos, por el estado de dimerización de la α -Catenina y por la unión a otras proteínas de unión a Actina. También hay evidencias de que las uniones adherentes son mecano-sensibles, lo que puede ser particularmente relevante durante la morfogénesis.

1.6. Mecano-sensibilidad del complejo Cadherina-Catenina.

Existen cada vez más evidencias de que las uniones adherentes son estructuras mecano-sensibles cuya dinámica y función puede modularse por tensión. En un trabajo recientemente publicado se ha propuesto un mecanismo dependiente de tensión que genera la estabilidad mínima necesaria para la unión del complejo Cadherina-Catenina con el citoesqueleto de actomiosina. Los experimentos consistían en adherir un único filamento de Actina a dos bolas atrapadas ópticamente y dispuesto en paralelo a un complejo Cadherina-Catenina con el que se une directamente. Aplicando fuerzas de diferente magnitud en el filamento y midiendo el tiempo de la unión al complejo de adhesión se observó un **requerimiento de tensión** que define dos estados diferentes de unión: uno débil y de rápida disociación que da paso rápidamente a otro de unión fuerte, estable y de mayor duración. Ambos estados de unión corresponderían con diferentes estados conformacionales de α -Catenina como monómero (Buckley et al., 2014).

El desarrollo de sensores de tensión FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) que permiten la detección de moléculas bajo tensión en tiempo real ha proporcionado un método no invasivo para el estudio de la mecano-sensibilidad de los sistemas celulares. En concreto, durante la migración colectiva de las células del borde del oocito de *Drosophila*, E-Cadherina está sometida a una mayor tensión en el frente de migración que en la región trasera, sirviendo como mecanismo para transmitir la

información por parte de la célula que lidera el frente a las que se sitúan atrás. Además, la diferente adhesión celular mediada por E-Cadherina funciona como un mecanismo de retroalimentación con la GTPasa Rac, estabilizando el frente de avance (Cai et al., 2014). Por otro lado, un sensor FRET desarrollado para α -Catenina en cultivos celulares ha revelado la habilidad de α -Catenina para cambiar su conformación de manera inmediata y reversible en respuesta a perturbaciones mecánicas, apoyando el modelo propuesto de α -Catenina como una molécula elástica y mecano-transductora de la actividad entre el citoesqueleto y las uniones intercelulares (Kim et al., 2015). Por último, se ha propuesto a través de un sensor FRET que la Vinculina es requerida para la estabilización de la adhesión en las adhesiones focales según la tensión a la que está sometida la Vinculina. En condiciones de tensión elevada la Vinculina favorece el ensamblaje de las adhesiones, mientras que cuando la tensión es menor, la Vinculina se favorece el des-ensamblaje de las uniones y la migración de las células en cultivo (Grashoff et al., 2010).

En mamíferos, se ha propuesto que la **Vinculina** se une directamente a la α -Catenina monomérica gracias a un cambio conformacional que desenmascara el sitio de unión del dominio VBD de α -Catenina. Dicho cambio estructural sería dependiente de fuerza, la cual es transmitida a la Catenina por el citoesqueleto de actomiosina en condiciones de tensión (Yonemura et al., 2010). Por otro lado, se ha descrito la necesidad de un cambio conformacional en la Vinculina para ser activa y poder unirse a α -Catenina en la región próxima a las uniones adherentes (Chen et al., 2005). La Vinculina no tiene ninguna actividad enzimática intrínseca, y aunque el mecanismo de activación no estaría resuelto parece plausible que su activación dependiera de la interacción con otras proteínas del complejo de adhesión o de los filamentos de Actina inclusive (DeMali et al., 2002). Una vez activada, la Vinculina permitiría abrir el dímero de α -Catenina, a continuación se uniría una primera molécula de Vinculina para posteriormente unirse una segunda y así formar un tretrámero Vinculina- α -Catenina con alta afinidad para unirse a los filamentos de Actina (Rangarajan and Izard, 2013). De manera alternativa, la Vinculina también podría unirse directamente a la Cadherina según experimentos en cultivos celulares (Hazan et al., 1997), de esta manera la

Vinculina podría servir como nexo de unión entre el complejo de adhesión y los filamentos de Actina independientemente de α -Catenina.

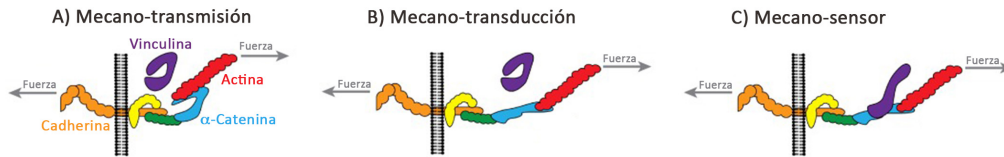


Figura 17. Modelo que representa los procesos dependientes de fuerza en el complejo Cadherina-Catenina. (A) En primer lugar, las fuerzas tienen que ser transmitidas a una estructura especializada en soportar la carga generada por el citoesqueleto de Actina, en este caso α -Catenina. (B) Después, la fuerza generada induce un cambio conformacional en α -Catenina, que des-enmascara un nuevo sitio de unión. (B) A continuación, el cambio conformacional permite la unión de Vinculina y de esta manera producir una respuesta celular, reclutando nuevos filamentos de Actina.

2. OBJETIVOS

El propósito principal de esta tesis doctoral ha sido estudiar los mecanismos que regulan la interacción entre el citoesqueleto de actomiosina y el complejo Cadherina-Catenina durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*. En particular, nos hemos enfocado en el proceso de cierre dorsal donde a través de la contracción apical de las células de la *amnioserosa* se produce una de las fuerzas más importantes para favorecer el proceso de cierre. Con este fin nos plantamos los siguientes objetivos:

- 1) Estudiar la función de α -Catenina durante el cierre dorsal utilizando un abordaje cuantitativo y multi-escalar.
 - 1.1. Caracterizar una serie alélica de α -Catenina que afecta a los dominios de unión a los filamentos de Actina (VH3) y de modulación de Vinculina (VH2).
 - 1.2. Describir los procesos celulares que contribuyen al cierre dorsal en los mutantes de α -Catenina.
 - 1.3. Investigar el comportamiento oscilatorio y contráctil de las células de la *amnioserosa* en los mutantes de α -Catenina.
 - 1.4. Analizar el papel de α -Catenina como regulador del complejo de adhesión y de la actividad pulsada del citoesqueleto de actomiosina en las células de la *amnioserosa*.
- 2) Investigar si existe un módulo mecano-sensible en la *amnioserosa* mediado por la interacción entre Vinculina y α -Catenina.
- 3) Analizar la función de otras proteínas de unión a la Actina durante el cierre dorsal y la posible conservación de su función durante el proceso de gastrulación de *Drosophila*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Genética de *Drosophila melanogaster*.

3.1.1. Cultivos de *Drosophila*.

Las estirpes de *Drosophila melanogaster* se cultivaron a 18°C o 25°C de temperatura y 60% de humedad en un medio estándar que contiene glucosa, levadura, agar, harina, ácido propiónico y nipagin. El criado y cultivo de las estirpes se realizó siguiendo las técnicas básicas descritas en Greenspan (1997). Los cruces y las placas de puestas para embriones utilizadas en los diferentes experimentos fueron llevados a cabo a una temperatura uniforme de 25°C. Los embriones fueron recolectados en placas de puesta que contienen agar y zumo de uva, suplementada con levadura fresca.

3.1.2. Estirpes de *Drosophila*.

A continuación se detallan las estirpes utilizadas junto con su descripción y referencia bibliográfica correspondiente. A menos que se indique, las moscas se obtuvieron de *Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC)*.

Líneas mutantes:

α -Cat¹, alelo amorfo que produce la falta de función de α -Catenina (Sarpal et al, 2012).
y, w, hs-Flp1.22; ; α -Cat¹³, FRT80E1 / TM3, Ser, Sb, GFP (Joaquín de Navascués).
y, w, hs-Flp1.22; ; α -Cat²⁰⁴⁹, FRT80E1 / TM3, Sb, Ser, GFP (Joaquín de Navascués).
y, w, hs-Flp1.22; ; α -cat⁴²¹, FRT80E1 / TM3, Sb, Ser, GFP (Joaquín de Navascués).
y, w, hs-Flp1.22; ; ubi-GFP, FRT80E1 / TM6B (Joaquín de Navascués).
shg^{g317}, alelo antimorfo de DE-Cadherina que actúa como dominante negativo (Tepass et al, 1996).

Δ Vinc, alelo amorfo que produce la falta de función de Vinculina (Klapholz et al., 2015).
 Δ Vinc; ; α -Cat¹/TM6, Tb (este trabajo).
 Δ Vinc; ; α -Cat¹³/TM6, Tb (este trabajo).
 Δ Vinc; ; α -Cat²⁰⁴⁹/TM6, Tb (este trabajo).
 Δ Vinc; ; α -Cat⁴²¹/TM6, Tb (este trabajo).

Líneas que expresan proteínas fluorescentes:

DE-Cadherina::GFP, alelo *knock-in* de DE-Cadherina con GFP como marcador de fluorescencia (Huang et al., 2009a).
DE-Cadherina::GFP; α -Cat¹³/TM3, Sb GFP (este trabajo).

DE-Cadherina::GFP; α -Cat²⁰⁴⁹/TM3, Sb GFP (este trabajo).
DE-Cadherina::GFP; α -Cat⁴²¹/TM3, Sb GFP (este trabajo).
DE-Cadherina::mTomato, alelo *knock-in* de DE-Cadherina con Tomato como marcador de fluorescencia (Huang et al, 2009).
ubi-DE-Cadherina::GFP, alelo de DE-Cadherina fusionado a GFP en su extremo C-terminal y bajo el promotor de ubiquitina (Oda and Tsukita, 2001).
ubi-DE-Cadherina::GFP; α -Cat¹/TM6, Tb (este trabajo).
ubi-DE-Cadherina::GFP; α -Cat²⁰⁴⁹/TM6, Tb (este trabajo).
 α -Cat^{CPT1002342}, *protein trap* de α -Catenina con YFP como marcador de fluorescencia (Lowe et al., 2014), *Kyoto Stock Center*.
sGMCA, dominio de unión a actina de la proteína Moesina fusionada a GFP y bajo el control del promotor del gen *spaghetti squash* (Kiehart et al, 2000).
sGMCA; α -Cat¹³/TM3, Sb GFP (este trabajo).
sGMCA; α -Cat²⁰⁴⁹/TM3, Sb GFP (este trabajo).
sGMCA; α -Cat⁴²¹/TM3, Sb GFP (este trabajo).
sGMCA; shg^{g317} (este trabajo).
Zipper CPT10297, *protein-trap* del gen *zipper* que codifica para la cadena pesada de Miosina-II no muscular con YFP como marcador de fluorescencia (Kyoto Stock Center).
DE-Cadherina::mTomato, Zipper CPT10297 (colección laboratorio).
DE-Cadherina::mTomato, Zipper CPT10297 ; α -Cat²⁰⁴⁹/TM3, Sb GFP (este trabajo).
Vinculina::GFP (Klapholz et al., 2015).
Vinculina::GFP; α -Cat²⁰⁴⁹/TM3, Sb GFP (este trabajo).
Vinculina::GFP; α -Cat⁴²¹/TM3, Sb GFP (este trabajo).
 α -Actinina CC1916, fusión de GFP en la región codificante de α -Actinina (Quinones-Coello et al., 2007).
Cheerio CPT11399, *protein trap* de α -Catenina con YFP como marcador de fluorescencia (Huelsmann et al., 2013. Kyoto Stock Center).
sqhAX3; sqh::GFP (Adam Martin).
sqh::GFP; Gap43mChFP (Adam Martin).

Líneas Gal4:

c381-Gal4 / CyO, se expresa en la práctica totalidad de las células de la *amnioserosa* (Manseau et al., 1997).
c381-Gal4, DE-Cadherina::GFP / CyO (colección del laboratorio).
c381-Gal4, DE-Cadherina::mTomato / CyO (este trabajo).
c381-Gal4 / CyO; α -Cat¹ / TM6, Sb GFP (este trabajo).
c381-Gal4 / CyO; α -Cat²⁰⁴⁹ / TM6, Sb GFP (este trabajo).
 α -Actinina CC1916; c381-Gal4, DE-Cadherina::mTomato (este trabajo).
c381-Gal4, DE-Cadherina::mTomato; Cheerio CPT11399 (este trabajo).
e22C-Gal4 / CyO, se expresa en la epidermis del embrión y en las células de la AS (Lawrence et al., 1995).

e22C-Gal4 / CyO; α -Cat¹ / TM6, Sb GFP (este trabajo).
 e22C-Gal4 / CyO; α -Cat²⁰⁴⁹ / TM6, Sb GFP (este trabajo).
prd-Gal4 / TM6, *Tb*, se expresa en los segmentos pares del embrión y en algunas células de la AS (Brand y Perrimon, 1993).
DE-Cadherina::GFP; *prd-Gal4* / TM3, Sb GFP (este trabajo).
Maternal67-Gal4, *sqh::GFP* / *Maternal15-Gal4*, *Gap43mChFP* (Adam Martin).
Maternal67-Gal4, *sqh::GFP* / *Gap43mChFP* (Adam Martin).
Daughterless-Gal4

Líneas UAS:

UAS-Vinculina::VenusYFP, sobre-expresión de Vinculina fusionada a YFP (este trabajo).
UAS-sqh^{DD} / CyO, constructo que sobre-expresa una forma constitutiva de la cadena ligera de la Miosina-II no muscular (Mitonaka et al., 2007).
UAS-sqh^{DD} / CyO; α -Cat¹ / TM6, *Tb* (este trabajo).
UAS-sqh^{DD} / CyO; α -Cat¹³ / TM6, *Tb* (este trabajo).
UAS-sqh^{DD} / CyO; α -Cat²⁰⁴⁹ / TM6, *Tb* (este trabajo).
UAS-sqh^{DD} / CyO; α -Cat⁴²¹ / TM6, *Tb* (este trabajo).
UAS-ctMLCK / CyO, forma constitutivamente activa de la quinasa que fosforila la cadena ligera de la Miosina-II no muscular (Kim et al., 2002).
Vinculina::GFP; *UAS-ctMLCK* / CyO (este trabajo).
UAS-Mbs / CyO, forma constitutivamente activa de la fosfatasa que defosforila la cadena ligera de la Miosina-II no muscular (Lee and Treisman, 2004).
UAS- α -Catenina::GFP / CyO, (Oda y Tsukita, 1999).
UAS- α -Catenina::GFP / CyO; α -Cat¹ / TM6, *Tb* (este trabajo).
UAS- α -Catenina::GFP / CyO; α -Cat²⁰⁴⁹ / TM6, *Tb* (este trabajo).
UAS- α -Catenina^{shRNA} HMS00636 / CyO (Ni et al., 2011).
UAS- α -Catenina^{shRNA} HMS00317 / TM3, Sb (Ni et al., 2011).
UAS-DE-Cadherina::GFP / CyO, (Tepass et al., 1996).
UAS-DE-Cadherina:: α -Catenina / CyO, fusión de DE-Cadherina con α -Catenina (Pacquelet and Rorth, 2005).
UAS-DE-Cadherina:: α -Catenina / CyO; α -Cat¹ / TM6, *Tb* (este trabajo).
UAS-DE-Cadherina:: α -Catenina / CyO; α -Cat²⁰⁴⁹ / TM6, *Tb* (este trabajo).
UAS-WASp^{Myr} / TM6, *Tb*, (Bogdan et al., 2005).
UAS- α -Catenina::GFP / CyO; *UAS-WASp^{Myr}* / TM6, *Tb* (este trabajo).
UAS-DE-Cadherina::GFP / CyO; *UAS-WASp^{Myr}* / TM6, *Tb* (este trabajo).
UAS-WASp.25 / TM6, *Tb*, (Eyal D. Schejter).
UAS- α -Catenina::GFP / CyO; *UAS-WASp* / TM6, *Tb* (este trabajo).
UAS- α -Catenina^{shRNA} / CyO; *UAS-WASp* / TM6, *Tb* (este trabajo).
UAS- α -Actinina^{shRNA} HMS00193 (Ni et al., 2011).
UAS-Cheerio^{shRNA} HMS01501 (Ni et al., 2011).
UAS-deGradFP / CyO (Causinus et al., 2012).

α-Actinina CC01916; UAS-deGradFP (este trabajo).
UAS-deGradFP; Cheerio CPTI01399 (este trabajo).

Otras líneas:

Oregon-R, utilizada como línea control en los experimentos de Inmunoblot (colección laboratorio).

w ; If / CyO^{ftz-lacZ} ; MKRS / TM6B, utilizada como línea balanceadora, permite la no recombinación de los cromosomas de las hembras durante la realización de las líneas utilizadas en este trabajo (colección laboratorio).

3.1.3. Líneas Recombinantes.

La recombinación se realizó para unir dos alelos localizados en el mismo cromosoma. En esta tesis, la línea *c381-Gal4* fue recombinada con la línea *DE-Cadherina::mTomato*. La línea *Gal4* tiene un alelo *w+* en un fondo *w-*, de esta manera la presencia de dicho constructo se puede seguir a través del color de ojo rojo. Posteriormente, la presencia de la línea *DE-Cadherina::mTomato* fue comprobada al microscopio tomando imágenes del embrión. Por último, se comprobó que se trataba de la línea *Gal4* específica de *amnioserosa* sobre-expresando la línea *UAS-diaphanous^{CA}*, para la cual se ha descrito que se produce una reducción del tamaño de las células de la *amnioserosa* (Fischer et al., 2014).

3.1.4. Generación de línea transgénica.

Para la línea *UAS-Vinculina::VenusYFP*, amplificamos la región codificante (CDS) para el ADN de Vinculina de *Drosophila melanogaster* (SD03117) por PCR utilizando la secuencia de reconocimiento de los siguientes *primers* (F=forward; R=reverse): Vinculina-F, 5' AAATGCCCGTCTTTCACA 3'; Vinculina-R, 5' CGCCAAGTACTGGTACCAC 3'. Los *primers* utilizados fueron previamente analizados (PREMIER Biosoft International). Posteriormente, clonamos el producto de amplificación con en el vector de entrada pENTR/D-TOPO por clonaje direccional (Gateway system; Invitrogen) e introducido por recombinación en el vector de destino pTWV (pUAST-VenusYFP) y comprobamos por secuenciación el resultado final. Las reacciones de digestión, ligación y transformación se realizaron según los protocolos descritos en Green, 2012. Finalmente, el servicio de

transgénesis del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) transformó embriones yw con el vector final mediante microinyección. Se comprobó que la construcción funcionaba correctamente cruzando moscas *C381-Gal4* con moscas *UAS-Vinculina::VenusYFP* y observando los embriones resultantes del cruce en el microscopio.

3.1.5. Generación de clones de recombinación mitótica.

Realizamos clones de recombinación mitótica para serie alélica de α -Catenina mediante el sistema Flipasa/FRT (FLP/FRT) procedente de levaduras (Xu and Rubin, 1993). Tanto la línea ubiGFP como cada línea mutante llevan insertado un elemento FRT (*Flp Recombinase Target*) en la misma posición en los cromosomas homólogos, y de esta manera recombinar entre sí en el mismo lugar gracias a la actividad de la recombinasa FLP. Como resultado de la recombinación se generarán células homocigotas para el alelo mutante (GFP negativas), heterocigotos (GFP positivas) y homocigotos para ubi-GFP (GFP doble positiva). La recombinasa se activa a una temperatura de 37°C (*heat-shock*), permitiendo controlar el tamaño del clon según el estadio del desarrollo y el número de clones según la duración del *heat-shock*. Los clones fueron generados 48-72 horas tras la fecundación durante 30-45 minutos. Los experimentos se realizaron cruzando la línea ubi-GFP (*y w, hs-Flp1.22; ; ubi-GFP, FRT80E1*) con cada línea mutante, (*y w, hs-Flp1.22; ; α -cat^{-/-}, FRT80E1/ TM3, Sb, Ser, GFP*).

3.1.6. Sistema Gal4/UAS.

El sistema Gal4/UAS de expresión génica dirigida requiere dos líneas transgénicas. La primera expresa la proteína Gal4 en un patrón determinado por las regiones reguladoras adyacentes y la segunda posee el ADN codificante del gen que se quiere expresar ectópicamente bajo el control de las secuencias reguladora UAS. Las secuencias UAS son reconocidas por la proteína Gal4, de manera que cruzando ambas cepas se obtiene una descendencia que expresa el transgén de interés en el patrón espacial y temporal de la línea Gal4 (Brand y Perrimon, 1993). Este método fue utilizado para sobre-expresar o bajar la función de diferentes proteínas.

3.1.7. Sistema deGradFP.

Este sistema utiliza el complejo de degradación de las proteínas en el Proteosoma. En primer lugar, las proteínas se unen a múltiples moléculas de Ubiquitina por la acción de los complejos enzimáticos E1, E2 y E3 ligasas. La enzima E3 ligasa es un componente crucial debido a que determina la alta especificidad de la vía de ubiquitinación. De esta manera, a través del sistema Gal4/UAS se sobre-expresa una versión de la enzima E3 ligasa, con un único dominio de un fragmento de anticuerpo que reconoce la proteína GFP (Green Fluorescent Protein) o sus derivados como la YFP (Yellow Fluorescent Protein). De esta manera se permite la bajada de función de proteínas unidas previamente a un marcador fluorescente (Caussinus et al., 2012). Utilizamos el sistema deGradFP para estudiar la función de α -Actinina y Filamina/Cheerio en la *amnioserosa*, con *protein-traps* como sistema de fusión de marcadores fluorescentes sin alterar los niveles endógenos. Realizamos los cruces manteniendo la homocigosis del *protein-trap* de modo que la proteína materna corresponde a la de origen fluorescente en su totalidad, de la siguiente manera:

F0: (hembras) α -Actinina::GFP; *c381-Gal4*, *DE-Cadherina::mTomato* X (machos) α -Actinina::GFP; *UAS-deGradFP*

F0: (hembras) *c381-Gal4*, *DE-Cadherina::mTomato*; *Cheerio::YFP* X (machos) *UAS-deGradFP*; *Cheerio::YFP*

F1: adquisición imágenes microscopio.

3.1.9. Cruces Maternal-Gal4/UAS-shRNA.

En primer lugar, cruzamos hembras *Maternal-Gal4* con machos *UAS-shRNA*. A continuación, hembras *Maternal-Gal4* > *UAS-shRNA* se cruzaron con machos *UAS-shRNA* (Staller et al., 2013). La descendencia de embriones se analizaron al microscopio para estudiar el proceso de gastrulación. A continuación, se muestra un ejemplo:

F0: (hembras) *Maternal67-Gal4*, *sqh::GFP*; *Gap43mChF* X (machos) *UAS-Cheerio^{shRNA}*

F1: (hembras) *Maternal67-Gal4*, *sqh::GFP*; *Gap43mChF*; *UAS-Cheerio^{shRNA}* X (machos) *UAS-Cheerio^{shRNA}*

F2: adquisición imágenes microscopio.

3.2. Preparación de cutículas.

Los embriones de *Drosophila* de 24 horas de edad y depositados en placas de agar con zumo de fruta y enriquecidas con levadura, se retiraron de las jaulas de puesta, donde se encontraban los progenitores adultos, y se dejaron envejecer 48 horas a 25°C. Posteriormente, se recogieron los embriones letales y se lavaron con hipoclorito de sodio (lejía) al 50% durante 2 minutos para eliminar el corion o membrana externa que recubre al embrión. A continuación, se montaron en portaobjetos con la membrana vitelina en ácido láctico-Hoyer's (1:1) y se incubaron durante la noche a 65°C. Las cutículas fueron analizadas en un microscopio vertical Axioskop (Zeiss, Jena, Alemania) utilizando objetivo 10X con Contraste Diferencial de Interferencia (DIC) Nomarski y las imágenes se tomaron con una cámara fotográfica CoolSNAP® FX monocroma (Roper Scientific, Florida, EEUU) usando el programa Metamorph®.

Para evitar la letalidad ocasionada por los cromosomas balanceadores se cruzaron los alelos mutantes con moscas silvestres (+/+), como muestra el siguiente ejemplo:

F0: (hembras) $\alpha\text{-cat}^{2049}/TM3, Sb, Ser, GFP$ X (machos) *Oregon-R* (+/+)

F1: (hembras) $\alpha\text{-cat}^{2049}/+$ X (machos) $\alpha\text{-cat}^{2049}/+$

F2: análisis cuticular.

3.3. Western Blot de embriones.

En primer lugar, los embriones de 0-16 horas se recolectaron de las placas de puesta a 25°C y se decorionaron según descrito anteriormente. Posteriormente, se seleccionaron los embriones en cierre dorsal (estadios 12-13) y se homogeneizaron en búfer de lisis SB (62,5mM Tris-HCl pH6,8; 2,3% SDS; 10% glicerol; 5% b-mercaptoetanol y 0,005% de azul bromofenol). A continuación, se cargó la proteína de lisados de embrión en geles de acrilamida en cada pocillo con una concentración de 1 embrión/1µl SB y se resolvió en búfer 1x SDS-PAGE (hecho de 10X: 250mM Tris-HCl; 1,92M glicina y 10 g SDS) a 100-120 voltios durante 1,5-2 horas. Seguidamente, las proteínas de los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham, Reino Unido) en búfer de transferencia 1X con 20% de metanol (obtenido de 10X:

250mM Tris-HCl; 1,92M glicina) a 300mA durante 1 hora. Las membranas se bloquearon en una solución de 5% leche en polvo diluida en PBST (0,05% Tween-20 en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron durante la noche con los anticuerpos primarios a 4°C. Al día siguiente se realizaron 4 lavados durante 5 minutos con PBST y se incubaron con el anticuerpo secundario en una solución de 5% leche en polvo diluida en PBST durante 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente, se realizaron 4 lavados durante 5 minutos y se revelaron las bandas usando el sistema ECL Select® (Amersham, Reino Unido). Los siguientes anticuerpos primarios fueron usados: anti- α -Catenina (monoclonal inmunizado en rata, DCAT-1, 1/400, DSHB) y anti- β -Tubulina (monoclonal inmunizado en ratón, E7, 1/10.000, DSHB). Los anticuerpos secundarios acoplados a HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, EEUU) fueron usados en una dilución 1/5.000.

3.4. Diseño y micro-inyección del ARN de doble cadena.

Los *primers* para ARN de doble cadena se diseñaron con E-RNAi (Arziman et al., 2005). Los *primers* incluían la secuencia del promotor T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') seguidos de la secuencia de reconocimiento (F=forward; R=reverse): Cheerio-F, 5'-GAGGAGCCCTGCTTCCTG-3'; Cheerio-R, 5'-TAACCTTGACCTTCTTGGCG-3'; α -Actinina-F, 5'-GATCGCTGGAGGACCAACT-3'; α -Actinina-R, 5'-GCAGCGTTTCATCGTGTAG-3'. Los pares de primers se usaron para amplificación mediante PCR a partir de ADN genómico. Con el producto de PCR se realizó la reacción de transcripción con la polimerasa T7 usando el kit de transcripción MEGAscript (Applied Biosystems). El anillamiento se realizó añadiendo 10mM EDTA, 0,1% SDS y 0,1M NaCl a la reacción e incubando la mezcla en un baño de agua caliente (>90°C) y se dejó enfriar durante 4 horas. A continuación, se realizó una extracción con fenol/cloroformo para purificar el ARN y se re-suspendió en el búfer de inyección (5mM KCl y 0,1mM fosfato sódico, pH 7,0). Por último, se estimó la concentración de los ARN por electroforesis y se inyectó una concentración de 4,6 mg/ml para Cheerio y de 3,4 mg/ml para α -Actinina.

En cuanto a la técnica de micro-inyección propiamente dicha, se recogieron embriones tempranos con 30 minutos de desarrollo, se dejaron secar durante un intervalos de 6-7 minutos para favorecer la inyección y se montaron en un portaobjetos recubiertos de

pegamento y con una gota de aceite Halocarbon 27/700 (Sigma) para evitar la deshidratación. A continuación, se inyectaron sincitialmente el respectivo ARN por el plano lateral del embrión y se dejaron incubar durante 2,5-3 horas a 25°C antes de producirse la gastrulación, momento en el que se realizó la toma de imágenes por confocal.

3.5. Inmuno-histoquímica.

Los ensayos de inmuno-histoquímica se realizaron usando el protocolo estándar descrito en Kaltschmidt et al., 2002. Los embriones de 0-16 horas se recolectaron de placas de puesta a 25°C y se decorionaron según descrito anteriormente. La fijación se realizó a temperatura ambiente durante 20 minutos en agitación y en una solución 1:1 (v:v) de paraformaldehído (PFA, 8% en PBS) y heptano. La fase de abajo se removió y reemplazó por metanol al 100% para desvitelinizar los embriones, resultando en una solución de heptano y metanol (1:1). La desvitelinización se realizó durante 20 segundos en agitación fuerte y los embriones se transfirieron a un eppendorf de 0.5 ml. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con metanol al 100% y 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBST (0,1% TritonTM X-100 en PBS). El bloqueo se realizó con suero de albúmina bovina (BSA) diluido al 1% en PBST durante 1 hora en agitación. Posteriormente, los embriones se incubaron durante la noche a 4°C en solución de bloqueo con los anticuerpos primarios (ver Tabla 1, para las diluciones) y se realizaron 4 lavados de 15 minutos cada uno con PBST. Seguidamente, la incubación con los anticuerpos secundarios fluorescentes se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación y oscuridad (ver Tabla 2, para las diluciones). Por último, se realizaron 4 lavados de 15 minutos cada uno con PBST y se montaron en portaobjetos con Vectashield® (Vector Laboratories, Burlingame, EEUU) y se guardaron las muestras a 4°C para su análisis.

Para la tinción de los microfilamentos de actina, se utilizó el reactivo Faloidina-TRITC (P-1951, Sigma, St. Louis, EEUU) y se añadió diluida 1/500 al PFA (solución 8%, grado EM, Electron Microscopy Sciences) durante la fijación y se usó etanol al 80% en lugar de metanol 100%. Los anticuerpos secundarios se añadieron junto con Faloidina-TRITC diluida 1/200.

Tabla 1: Lista de anticuerpos primarios utilizados.

Antígeno: animal inmunizado, dilución de uso, referencia, fuente.

α -Catenina: rata (monoclonal), 1/20, DCAT-1, Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa, Iowa City, EEUU).

WASp: cobaya, 1/500, donado por Sven Bogdan (Universität Münster, Alemania).

α -Actinina: rata (monoclonal), 1/20, MAC 276, Abcam (Cambridge, Reino Unido).

Armadillo: ratón (monoclonal), 1/50, N2 7A1, Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa, Iowa City, EEUU).

Zipper: conejo (monoclonal), 1/500, donado por Eric Wieschaus (Princeton University, NJ, EEUU).

Tabla 2: Lista de anticuerpos secundarios fluorescentes utilizados.

Antígeno: animal inmunizado, dilución de uso, referencia, fuente.

Alexa Fluor® 488: rata, 1/500, A-21202, Invitrogen, Carlsbad, EEUU.

Alexa Fluor® 555: rata, 1/500, A-21434, Invitrogen, Carlsbad, EEUU.

Alexa Fluor® 647: ratón, 1/500, A-31571, Invitrogen, Carlsbad, EEUU.

Alexa Fluor® 647: cobaya, 1/500, A-21450, Invitrogen, Carlsbad, EEUU.

DAPI, 1/200, 268298, Merck, Darmstadt, Alemania.

3.6. Medición de los niveles de fluorescencia para α -Catenina.

Utilizamos el software FIJI/ImageJ (Schindelin et al., 2012) para el análisis de los niveles de fluorescencia para α -Catenina en los diferentes embriones. Previamente, obtuvimos los valores medios de fluorescencia, la densidad integrada y el área de cada región seleccionada. Para cada embrión se seleccionaron tres regiones independiente para la epidermis y la *amnioserosa*. De la misma forma, se analizó una región sin señal de fluorescencia como fondo. Por último, calculamos la fluorescencia total corregida (CTF), a través de la siguiente fórmula: $CTF = \text{densidad integrada} - (\text{área seleccionada} \times \text{fluorescencia media del fondo})$.

3.7. Preparación de embriones y adquisición de imágenes en microscopio confocal invertido.

En primer lugar, los embriones de 0-16 horas se recolectaron de las placas de puesta a 25°C y se decorionaron según descrito anteriormente. Posteriormente, se seleccionaron los embriones en cierre dorsal (estadios 12-13) y se montaron con la región dorsal orientada hacia abajo en un portaobjetos recubierto con pegamento (cinta adhesiva Scotch® sumergida en heptano). En el caso del proceso invaginación

del futuro mesodermo se seleccionaron embriones en estadio previo a la gastrulación (estadios 5-6). Seguidamente, para evitar la des-hidratación de los embriones se cubrieron con una gota de aceite Voltalef® 10S (VWR, Radnor, EEUU). A continuación, se tomaron las imágenes de la *amnioserosa* a 25°C, usando un microscopio de barrido láser confocal LSM710® acoplado a un microscopio invertido AxioObserver® (Zeiss, Jena, Alemania), con objetivos de aceite de inmersión 40x/1,30 EC Plan-Neofluor para las películas de toda la *amnioserosa* y 63X/1,4 Plan-Apochromat para las películas de la dinámica del citoesqueleto. Las imágenes con reporteros fluorescentes GFP y mTomato se captaron con láser de Argón 488 nm y DPSS 561 nm, respectivamente. Para las películas *time-lapse* de toda la *amnioserosa*, se tomaron 12-15 secciones de 1,5 µm de inter-espaciado en el plano Z con un intervalo de tiempo de 30 segundos. Para las películas de la dinámica del citoesqueleto, se tomaron 5-6 secciones de 1 µm de inter-espaciado cada 10 segundos.

3.8. Análisis morfométrico de las células de la *amnioserosa*.

El análisis morfométrico de las células de la *amnioserosa* y las fluctuaciones se realizó usando el programa semi-automático 'oTracks', escrito con el lenguaje de programación *Interactive Data Language* (IDL, Exelis) y descrito previamente (Blanchard et al., 2009, Blanchard et al., 2010). En primer lugar, se segmentaron las imágenes obtenidas a través del confocal para reducir el ruido utilizando los filtros de la mediana y del paso alto (*highpass filter*). Seguidamente, se identificaron de manera automática la mayoría de las células que presentaban una señal de membrana buena, y además, se realizaron correcciones manualmente que consistían en eliminar las interfases registradas de manera incorrecta y en añadir aquellas células sin identificar. Posteriormente, una vez identificadas la mayoría de células de la *amnioserosa* durante el tiempo total de duración de la película, se usaron nuevos filtros para controlar el tamaño celular, eliminando las células que eran extremadamente pequeñas o grandes, y aquellas células que cambiaban drásticamente de tamaño entre dos intervalos de tiempo consecutivos. También se filtraron las células según el tiempo de duración, eliminando aquellas con una vida media demasiado breve. Dichos valores de filtrado se determinaron para cada película teniendo el compromiso de preservar el mayor número de células posible y a la vez descartando las células con una interfase errónea.

A continuación, las células seleccionadas finalmente se utilizaron para obtener los datos de área y perímetro apical de la célula, así como de las fluctuaciones en el área apical celular. En particular, para las medidas del perímetro celular, se eliminaron los artefactos ocasionados por el pixelado suavizando el perímetro total pero sin alterar la superficie real de la célula. En cuanto a las fluctuaciones, se realizó el análisis descrito previamente (Blanchard et al., 2010).

3.9. Alineamiento temporal de los embriones.

Para el alineamiento temporal de los embriones intra-genotipo se tuvieron en cuenta 3 parámetros con una evolución estereotipada a lo largo del cierre dorsal (Gorfinkiel et al., 2009): el área celular, la anisotropía en la forma celular y la longitud celular en su eje medio-lateral (Fig. S6). Esto nos permitió el cálculo del tiempo de desarrollo con una precisión de 10 minutos. En cuanto al alineamiento temporal inter-genotipo se realizó teniendo en cuenta la velocidad de deformación del tejido, que en el caso de los embriones mutantes de α -Catenina podría estar infravalorando un posible retraso en el comienzo de la contracción neta del tejido.

3.10. *Fluorescent Recovery After Photobleaching (FRAP)*.

Los experimentos de FRAP se realizaron con el microscopio de barrido láser confocal LSM710® acoplado a un microscopio invertido AxioObserver® (Zeiss, Jena, Alemania), con el objetivo de aceite de inmersión 63X/1,4 Plan-Apochromat. Se estableció una región circular de interés (ROI) con un radio de 0,5 μ m, en la membrana en el eje medio-lateral de la célula para reducir la variabilidad, y se quemó con el láser de Argón 488nm al 100% de potencia. Las imágenes se tomaron antes y después de la lesión cada 2 segundos y durante 2 minutos. Además, una región rectangular de 3,2 μ m² se tomó para tener en cuenta los efectos del quemado del láser para las condiciones de adquisición de las imágenes. Posteriormente, para el análisis del FRAP, se normalizó la fluorescencia a lo largo del tiempo para cada experimento individual y se realizó un ajuste exponencial con la siguiente fórmula: $I(t)=A(1-\exp(-bt))$, donde el parámetro A es la fracción móvil y b es $\ln 2/\tau_{1/2}$, siendo $\tau_{1/2}$ el instante de tiempo para el que se llega a una recuperación media de la intensidad de fluorescencia. Para estos cálculos se utilizaron las funciones *nlinfit* y *nlparci* (MATLAB, Natick, EEUU). Por último, se calculó

la media de cada parámetro y se compararon los estadios tempranos y tardíos intra-genotipo e inter-genotipo.

3.11. Ablación por láser.

Se aplicó la técnica de ablación por láser en las membranas de las células de la *amnioserosa* en su eje AP en embriones de estadio temprano y tardío (estadios 12-13, respectivamente), usando DE-Cadherina::GFP como marcador, y se calculó la velocidad de retraimiento y el desplazamiento máximo de los vértices más próximos a la membrana donde se produce la lesión. Debido a que la distribución del desplazamiento de las membranas lo largo del tiempo es exponencial, podemos asumir un comportamiento visco-elástico donde los vértices de las células están conectados por módulos Kelvin-Voigt, que consisten en la disposición en paralelo de un muelle y un émbolo, representando las propiedades elásticas (E) y viscosas (η) respectivamente. Del ajuste exponencial de los datos se obtienen dos parámetros: el desplazamiento máximo (D) y el tiempo en el que éste se hace constante (T). Y del producto de división entre ambos parámetros se obtiene la velocidad inicial de retraimiento (V). Relacionando las propiedades mecánicas con los parámetros obtenidos se obtienen las siguientes relaciones: $D=\text{tensión/rigidez}$; $T=\text{viscosidad/rigidez}$; $V=\text{tensión/viscosidad}$. Las ablaciones se realizaron con un láser Mai Tai Deep Sea (Spectra Physics) acoplado a un microscopio de barrido láser confocal LSM710® (Zeiss, Jena, Alemania), con el objetivo de aceite de inmersión 63X/1,4 Plan-Apochromat. Posteriormente, el seguimiento del retraimiento de los vértices tras la ablación se calculó automáticamente con el programa Mathematica (Wolfram Research). Por último se calculó la media de cada parámetro y se compararon los estadios tempranos y tardíos intra-genotipo e inter-genotipo.

3.12. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de las cutículas se realizó a través de la prueba Z que evalúa el nivel de significación tras calcular la diferencia entre 2 proporciones de muestras independientes (VassarStats, NY EEUU). Cada proporción es el resultado de dividir el número de observaciones para cada categoría fenotípica entre el número total de observaciones de la muestra. Como resultado se obtiene el valor llamado z-ratio,

donde los rangos de valores de 0-1,64; 1,64-2,33 y >3,09 corresponden a un p-valor <0,05; <0,01 y <0,001, respectivamente.

Para el análisis estadístico referente la dinámica de focos de actina calculamos promediando los valores de duración del foco e intervalo de tiempo entre focos consecutivos considerando a cada foco como un evento individual (Fig. Sup. 8). La comparación entre fenotipos se realizó a través de la prueba Mann-Whitney debido a que los datos no desarrollaban una distribución normal, previamente testado con el test Kolmogorov-Smirnov (MATLAB Statistics Toolbox).

En cuanto al análisis estadístico de las oscilaciones y del área y perímetro de las células de la *amnioserosa* utilizamos el modelo linear-mixto descrito con anterioridad (Butler et al., 2009, Fischer et al., 2014). La distribución de datos para cada parámetro se representó para el intervalo de tiempo comenzando en la fase temprana del cierre dorsal (-50 minutos) hasta la fase rápida de contracción del mismo, y definida para los embriones silvestres (150 minutos). Con el objetivo de reducir el ruido, tanto la media como el error estándar se calcularon a partir de datos promediados cada 10 minutos. Las regiones coloreadas en gris representan las diferencias entre los embriones mutantes y silvestres con un p-valor $\leq 0,05$.

Por último, para el resto de experimentos realizados en este tesis doctoral calculamos las diferencias significativas aplicando la prueba t de Student para dos muestras con varianzas no iguales, tras comprobar que los datos tenían una distribución normal con el test Kolmogorov-Smirnov (MATLAB Statistics Toolbox). En los casos de que la distribución no fuera de tipo normal, realizamos la prueba no-paramétrica Mann-Whitney. En ambos casos queda indicado en el pie de figura.

4. RESULTADOS.

4.1. Mutaciones puntuales en los dominios central y C-terminal de α -Catenina resultan en alelos de falta de función.

4.1.1. Presentación de los alelos mutantes para los dominios central y C-terminal de α -Catenina.

La proteína α -Catenina homóloga de *Drosophila* fue identificada por primera vez en 1993, demostrando a su vez que formaba parte del complejo de adhesión Cadherina-Catenina (Desai et al., 2013). Su proximidad al centrómero en el tercer cromosoma dificultó la generación de mutantes durante muchos años, debido a que se trataba de una región que no estaba muy bien caracterizada genéticamente. Con el objetivo de estudiar la función de α -Catenina en un contexto de morfogénesis, el Dr. Joaquín de Navascués realizó una mutagénesis química utilizando metanosulfonato de etilo (EMS) como agente mutagénico obteniendo 3 alelos con mutaciones puntuales en la región C-terminal y/o central de α -Catenina según los datos de secuenciación (datos no publicados). Estas líneas de *Drosophila* se denominaron α -Cat¹³, α -Cat²⁰⁴⁹ y α -Cat⁴²¹ (Fig. 1A).

El alelo mutante α -Cat¹³ produce la sustitución de una Valina (V, Val) por una Metionina (M, Met) en la posición 851 (V851M), dentro del dominio C-terminal o de unión a Actina VH3 (aminoácidos 709-868). Según los datos de alineamiento de la secuencia de α -Catenina de *Drosophila* con las de otras especies, la Valina de la posición 851 está conservada de manera absoluta con 10 especies diferentes, entre ellas la humana. No obstante, dicha conservación es parcial si comparamos con la secuencia de *C. elegans*, que tiene una Isoleucina en la posición 851 (Fig. 1B).

El alelo mutante α -Cat²⁰⁴⁹ tiene un codón de parada en la posición 668 (Q668*). Como resultado se sintetizaría una proteína truncada a la que le falta parte del dominio de unión a Actina. En este caso, se afectaría además la síntesis de las dos regiones no consecutivas dentro del dominio C-terminal necesarias para la interacción con los filamentos de actina propuestas en *C. elegans* (aminoácidos 687-742 y 826-927). En el alelo mutante α -Cat⁴²¹ se produciría una proteína con un truncamiento total de la

región de unión a Actina y parte de la región VH2 (aminoácidos 373-627), debido al codón de parada que se genera en la posición 459 (Q459*). En concreto, este alelo tendría afectado las regiones comentadas anteriormente para el alelo mutante α -Cat²⁰⁴⁹, y además, el dominio de modulación para la unión a Vinculina descrito en células de mamífero y dependiente de la tensión ejercida por el citoesqueleto de actomiosina que desplegaría la proteína desde su extremo C-terminal (Yonemura et al., 2010).

Posteriormente, el laboratorio de Ulrich Tepass consiguió generar el primer mutante nulo por medio de la inserción de un elemento P que elimina el primer exón del gen e imposibilita la síntesis de la proteína (Sarpal et al., 2012). El análisis del mutante nulo de α -Catenina (α -Cat¹) reveló un papel importante durante la embriogénesis, la oogénesis y el tejido imaginal de *Drosophila*, desvelando unos defectos similares a la falta de función de E-Cadherina (Sarpal et al., 2012). De esta manera se completaron los estudios de función realizados previamente en *Drosophila* a través del uso de la técnica del ARN de interferencia, la cual a pesar de no eliminar completamente la síntesis de la proteína, estableció el requerimiento de α -Catenina para la integridad y el funcionamiento normal de la unión adherente del embrión y la retina pupal de *Drosophila* (Magie et al., 2002, Cavey et al., 2008, Seppa et al., 2008).

Por lo tanto, dadas las diferencias descritas en las diferentes regiones afectadas por las diferentes mutaciones puntuales para cada uno de los alelos de α -Catenina nos preguntamos si resultarían también en diferencias fenotípicas durante el desarrollo embrionario de *Drosophila*.

4.1.2. Las formas mutantes de α -Catenina se localizan en la membrana de las células epiteliales de los discos imaginales.

Un estudio detallado de la estructura y función de α -Catenina reveló que el dominio VH1 de unión a E-Cadherina es el que contribuye en mayor medida a la localización de α -Catenina en la membrana (Desai et al., 2013). Esto nos sugería que la localización de las proteínas mutantes generada por los distintos alelos de α -Catenina con el dominio de unión a Actina y/o de modulación de Vinculina afectado, tendría lugar de manera normal en la membrana apical de la célula.

En primer lugar, comprobamos la existencia de α -Catenina de origen materno durante el cierre dorsal de *Drosophila*. Para ello medimos los niveles de fluorescencia de α -Catenina en embriones mutantes α -Cat¹, ya que en estos no se sintetiza nueva proteína (Sarpal et al., 2012). Como resultado obtuvimos una disminución significativa en los niveles de fluorescencia de α -Catenina de origen materno, tanto en la epidermis lateral como en la *amnioserosa*, tras comparar embriones homocigóticos para α -Cat¹ con embriones heterocigóticos, los cuales son viables en la etapa adulta (Fig. 2A-B).

Dado que la existencia de proteína materna durante el cierre dorsal dificultaría el estudio de la localización sub-celular de α -Catenina en los embriones mutantes α -Cat¹³, α -Cat²⁰⁴⁹ y α -Cat⁴²¹, se analizaron clones generados por recombinación mitótica en el disco imaginal de ala de *Drosophila* y correspondiente al estadio larvario nº3, en los cuales ya no hay proteína materna. Como resultado se obtuvo que las proteínas mutantes en el dominio de unión a Actina y de modulación de la unión a Vinculina se localizan en la membrana apical de las células del disco (Fig. 2C). Dicha observación corresponde con los datos anteriormente publicados en el epitelio folicular, donde la delección del dominio VH2 o VH3 no afecta a la localización sub-celular de α -Catenina u otros componentes de la unión adherente (Desai et al., 2013).

4.1.3. Los mutantes de α -Catenina afectan de manera diferencial los niveles de la proteína materna.

A continuación, para comparar la cantidad total de proteína materna en los mutantes y la existencia de la proteína truncada para el caso de los alelos α -Cat²⁰⁴⁹ y α -Cat⁴²¹, realizamos ensayos por Western Blot de lisados de embrión en estadio de cierre dorsal. Como resultado observamos una bajada significativa en los niveles de α -Catenina en los lisados de embriones mutantes α -Cat²⁰⁴⁹ y α -Cat⁴²¹, con un tamaño esperado de 102.4 kDa y que correspondería a la proteína materna (Fig 3A-B). En estos lisados la expresión relativa de proteína es menor que la observada para el mutante nulo (20-30% frente a 60%) lo que sugiere que la proteína materna en los embriones mutantes α -Cat²⁰⁴⁹ y α -Cat⁴²¹ es menos estable que en el mutante nulo. En cuanto a los embriones mutantes α -Cat¹³ no se observaron cambios en los niveles de α -Catenina. No obstante, no sabemos si los niveles de la proteína materna están

afectados debido a que el tamaño esperado para la proteína mutante es el mismo que el de la proteína silvestre. Por lo tanto, no pudimos comprobar si la estabilidad de la proteína se veía afectada debido a la sustitución de la Valina conservada.

Respecto a las proteínas truncadas, no fuimos capaces de observar una banda del tamaño esperado para el alelo $\alpha\text{-Cat}^{421}$ y que corresponde al tamaño molecular de 55KDa. En cambio, sí detectamos la banda de tamaño esperado para el alelo mutante $\alpha\text{-Cat}^{2049}$ de 80KDa (Fig. 3C). Sin embargo, también detectamos la misma banda para los lisados de embriones control, $\alpha\text{-Cat}^1$ y $\alpha\text{-Cat}^{13}$. El trabajo donde se produjo el anticuerpo utilizado en nuestros ensayos demuestran la existencia de un producto de degradación con un tamaño muy similar al esperado para la truncada. La diferencia radica en que éste es detectado en estadios embrionarios posteriores a los del cierre dorsal (Oda et al., 1993). Por lo tanto, para saber si en los embriones mutantes $\alpha\text{-Cat}^{2049}$ la banda de 80KDa correspondía al producto de degradación o de la proteína truncada, comparamos los niveles relativos de la proteína truncada respecto a la materna y obtuvimos un incremento significativo para el alelo $\alpha\text{-Cat}^{2049}$ respecto al control (Fig. 3C). Sin embargo, el hecho de que haya una desestabilización de la proteína materna nos impide discernir si se trata de la proteína truncada o del producto de degradación. Por lo tanto, al no hallar dicha banda en los embriones mutantes $\alpha\text{-Cat}^{421}$, los cuales también presentan una menor estabilidad de la proteína materna sugiere que la banda de 80kDa en los embriones mutantes $\alpha\text{-Cat}^{2049}$ es específica y corresponde a la proteína truncada. Los mismos resultados se obtuvieron utilizando un anticuerpo de diferente origen para α -Catenina (datos no mostrados).

4.1.4. Los mutantes del dominio de unión a Actina y de modulación a Vinculina de α -Catenina presentan letalidad embrionaria.

Una forma de evaluar la función de α -Catenina durante el desarrollo embrionario de *Drosophila* es analizar el fenotipo de las cutículas depositadas por los embriones mutantes para los distintos alelos. El mutante nulo es letal embrionario en homocigosis y las cutículas del mismo muestran la formación de agujeros en la región anterior de la epidermis lo que es indicativo de fallos en la involución de la cabeza (Sarpal et al., 2012). Según trabajos previos, este tipo de agujeros también podría estar

indicando fallos en la región dorsal del embrión de *Drosophila*. Por un lado, la involución de la cabeza y el cierre dorsal ocurren de manera simultánea en el desarrollo embrionario, una vez se ha retraído la banda germinal. Por otro lado, ambos procesos morfogénicos comparten moléculas clave para su desarrollo, como son los efectores de señalización Dpp o JNK, y las proteínas del citoesqueleto y del complejo de adhesión (VanHook and Letsou, 2008).

Los 3 alelos del dominio C-terminal causan letalidad embrionaria en homocigosis y el análisis cuticular asociado también revela un predominio de agujeros en la región anterior del embrión (Fig. 4A-F). Con el objetivo de realizar un estudio comparativo entre los diferentes alelos atendiendo a la severidad de los agujeros, se clasificaron los defectos cuticulares siguiendo las categorías definidas en el trabajo realizado previamente con el mutante nulo (Sarpal et al., 2012). Para ello se clasificaron los defectos observados en 5 categorías: (0) embriones letales sin defectos morfológicos pero que permanecían en las placas de puesta tras 48 horas, (1) agujero anterior de tipo leve sin afectar el último segmento torácico (T3), (2) agujero anterior de tipo severo que traspasa el último segmento torácico (T3), (3) agujero en la región dorsal independiente de las lesiones anteriores y (4) agujero anterior y dorsal que deja el embrión abierto totalmente.

A la hora de realizar una comparación estadística utilizamos las proporciones de los distintos fenotipos del alelo mutante $\alpha\text{-Cat}^1$ como referencia (Fig. 4G). Como resultado, no observamos diferencias significativas en cuanto al porcentaje relativo de embriones que exhiben agujeros anteriores para los distintos alelos. Además, observamos un número reducido de casos en los que está afectada la región dorsal del embrión propiamente dicha, siendo el alelo mutante $\alpha\text{-Cat}^{421}$ el que presenta un aumento significativo de embriones con agujero dorsal o abierto antero-dorsalmente.

A continuación, para entender cómo surgen los agujeros que observamos a nivel de las cutículas, decidimos hacer películas *time-lapse* del desarrollo embrionario de mutantes en estadios de cierre dorsal e involución de la cabeza, los 2 procesos que podrían estar afectados en estos embriones.

4.2. Diferentes procesos celulares se ven afectados durante el cierre dorsal en los embriones mutantes para α -Catenina.

4.2.1. Los embriones mutantes para α -Catenina presentan defectos que afectan los procesos del cierre dorsal y de la involución de la cabeza.

A la hora de realizar películas *time-lapse* de embriones silvestre y homocigotos para cada mutante utilizamos el alelo knock-in de DE-Cadherina::GFP como marcador de los contornos celulares. Esta inserción permite la visualización de la membrana apical de las células sin afectar a la viabilidad del embrión, gracias al eficaz método de modificación del alelo por otro marcado con GFP en el mismo locus del gen diana (Huang et al., 2009b).

Como se observa en las películas e imágenes (Fig 5; Fig. Sup. 1-5) los embriones mutantes son capaces de llegar a estadios intermedios del desarrollo y comenzar el cierre dorsal con normalidad debido a la contribución materna de la α -Catenina. Sin embargo, en la mayoría de los embriones los defectos en la región anterior aparecen una vez ha progresado el cierre. Durante este tiempo del desarrollo, se produce el proceso conocido como involución de la cabeza, en el cual los 2 primordios de la cresta dorsal se elongan para fusionarse en la línea dorsal media y crear una estructura única. Seguidamente, la cresta dorsal comienza a moverse anteriormente constituyendo el frente de avance del resto de epidermis dorso-anterior y se produce la invaginación de los segmentos de la cabeza hacia el interior del embrión (Fig. 5i-iv). En los embriones mutantes para α -Catenina no se producen los movimientos morfológicos asociados a la cresta dorsal y como consecuencia se desarrollan agujeros de menor o mayor tamaño a lo largo de la región anterior del embrión (Fig. 5i'-iv'). Respecto al proceso del cierre dorsal, la *amnioserosa* y la epidermis se despegan en la región anterior y el *leading-edge* tarda más tiempo en adquirir una apariencia recta, lo que es importante para la generación de fuerzas en favor del cierre (Hutson et al., 2003).

En cuanto a la región posterior, no observamos agujeros ni otros defectos severos que comprometan la continuidad entre la epidermis y la *amnioserosa*. En primer lugar, la banda germinal se retrae con normalidad, y teniendo en cuenta que las células de la *amnioserosa* en contacto directo con la región caudal del embrión asisten

mecánicamente dicho proceso sería otra evidencia de que la falta de función de α -Catenina no tiene defectos más tempranamente. Asimismo, el proceso del cierre en cremallera o *zippering* en el canto posterior se produce con aparente normalidad y progresa a lo largo del cierre hacia la región media del embrión salvo que la severidad de los agujeros anteriores lo impidan. Sin embargo, sí se observan defectos en el alineamiento de los espiráculos, cuya proceso de formación es utilizado como modelo de estudio de los mecanismos genéticos que controlan la morfogénesis (Hu and Castelli-Gair, 1998).

Por lo tanto, los embriones mutantes para α -Catenina presentan defectos diversos en los procesos morfogenéticos que se desarrollan durante la embriogénesis medio-tardía de *Drosophila*. Con el objetivo de determinar en qué medida el cierre dorsal está afectado, a continuación realizamos un análisis cuantitativo del proceso.

4.2.2. Los embriones mutantes para los dominios C-terminal y de modulación de Vinculina de α -Catenina presentan una reducción de la velocidad del cierre dorsal.

Una forma de analizar cuantitativamente el progreso del cierre dorsal es midiendo la velocidad de avance del *leading-edge* en su eje de simetría, la cual es constante en una situación control (Hutson et al., 2003). De esta manera se midió el eje menor de la elipse formada por la *amnioserosa* (Fig. 5i-i') y se calculó la velocidad del cierre a través de la pendiente de su longitud, a partir del tiempo en que se empieza a observar una reducción neta de este parámetro (50 minutos).

En embriones mutantes observamos una reducción significativa de la velocidad del cierre comparado con el control (Fig. 6B-D). Por el contrario, el mutante nulo no mostró ninguna reducción de la velocidad (Fig. 6A). Como se ha descrito anteriormente estos embriones desarrollan agujeros en la región anterior, por lo tanto nos preguntamos si eran la causa de la reducción de la velocidad o si la reducción del avance del *leading-edge* se debía a defectos en las fuerzas que dirigen el cierre. Para abordar esta cuestión utilizamos el hecho de que para un mismo genotipo, hay embriones que desarrollan agujeros anteriores (categoría cuticular nº2) y embriones en los que no aparecen estos agujeros anteriores (categoría cuticular nº1). Para el caso del alelo mutante α -Cat¹, los embriones que desarrollan agujeros no presentan

diferencias en la velocidad del cierre comparados con los embriones que no desarrollan agujeros (Fig. 6A, ii-iii). Para el caso del alelo α -Cat⁴²¹, tanto los embriones que desarrollan agujeros anteriores como los que no presentan una reducción significativa de la velocidad del cierre con respecto a los embriones silvestres (Fig. 6C, ii''-iii''). Por último, las diferencias en la velocidad del cierre en embriones mutantes α -Cat¹³ se debe a los casos en que se desarrollan agujeros que afectan en mayor medida a la región dorsal. Y de manera similar al mutante nulo, los embriones con agujero anterior no presentan defectos en la velocidad de cierre.

A continuación, nos planteamos si se observaban los mismos defectos si alterábamos la función de α -Catenina de manera específica en la *amnioserosa*. Para ello expresamos ectópicamente dos ARN de interferencia (ARNi) para reducir la expresión de α -Catenina de manera simultánea y específica en el dominio de la *amnioserosa* con el driver *c381-Gal4*. Esta línea Gal4 también se expresa tempranamente en algunas células epidérmicas más dorsales como pudimos comprobar expresando proteínas fluorescentes (Fig. 21A). Bajo estas condiciones, se obtiene una bajada significativa de la señal de fluorescencia para algunas células de la epidermis más dorsal acompañado de leves defectos en la región anterior del embrión (Fig. 7). Nuevamente y de manera similar que en los embriones mutante nulo, no se obtiene una reducción de la velocidad con y sin presencia de agujero anterior (Fig. 6E). Una de las causas de no ver defectos en la velocidad del cierre con el uso de la técnica del ARNi puede deberse a que no se están disminuyendo los niveles de α -Catenina de manera efectiva en las células de la *amnioserosa* y solamente en las células epidérmicas más dorsales.

Por lo tanto, la velocidad del cierre dorsal está afectada en los embriones mutantes α -Cat²⁰⁴⁹ y α -Cat⁴²¹ y no solo de manera indirecta por defectos en la zona anterior. Esto nos lleva a sugerir que las distintas fuerzas que contribuyen al cierre dorsal como la contracción apical de las células de la *amnioserosa*, el cable supracelular de actomiosina y/o el cierre en cremallera, son deficientes.

4.2.3. Los embriones mutantes de α -Catenina presentan un mayor número de delaminaciones.

Otro proceso que contribuye a la consecución del cierre dorsal es la extrusión de aproximadamente el 10% de las células de la *amnioserosa* por su plano basal, a través de un mecanismo que comprende cambios en el citoesqueleto de la célula delaminada y sus vecinas (Fig. 8A), (Meghana et al., 2011, Muliyl et al., 2011, Muliyl and Narasimha, 2014). Un aumento significativo en el número de células delaminadas acelera la consecución del cierre (Toyama et al., 2008). Por ello nos preguntamos si el enlentecimiento en la velocidad del cierre observado en los embriones mutantes estaba asociado a una reducción en el número de delaminaciones. En contra de lo previsto, se observa que el número de delaminaciones totales en los embriones mutantes de α -Catenina es significativamente mayor que en los embriones silvestres (Fig. 8B).

A continuación, para descartar que dicho aumento en el número de delaminaciones estuviera relacionado por el propio incremento en el tiempo de duración del cierre en los mutantes, calculamos el número de delaminaciones relativas. Para ello, se estableció el límite temporal de 200 minutos, que corresponde a la duración máxima del cierre de un embrión silvestre. Previamente, se midió el número de células de la *amnioserosa* a tiempo inicial, el cual no presenta diferencias significativas entre genotipos (Fig. 8C). Como resultado se obtiene que el número relativo de delaminaciones es mayor en todos los mutantes, pero de manera significativa para los alelos mutantes α -Cat¹³ y α -Cat²⁰⁴⁹ (Fig. 8D).

Por lo tanto, el aumento observado en el número de delaminaciones en los embriones mutantes para α -Catenina sugiere que esto no es la causa de la reducción en la velocidad del cierre. No sabemos por qué aumenta el número de delaminaciones en los embriones mutantes para α -Catenina pero una posibilidad es que sea consecuencia de problemas de adhesión inter-celular dentro del tejido. Además, este resultado apoya la idea de que las otras fuerzas que contribuyen el cierre dorsal están siendo afectadas en los embriones mutantes para α -Catenina.

4.2.4. La morfología del cable supracelular de actomiosina y el cierre en cremallera están afectados en los embriones mutantes para α -Catenina.

Como se observa en las imágenes *in vivo* de los embriones mutantes para α -Catenina, el *leading-edge* está afectado. Este frente de avance lo lideran las células más dorsales de la epidermis, y en contacto directo con la *amnioserosa*, participando en dos procesos o estructuras que favorecen la consecución del cierre, el cable supracelular de actomiosina y el cierre en cremallera.

Como método para comprobar la morfología y funcionalidad del cable supracelular de actomiosina, en primer lugar, se utilizó la droga faloidina que permite la visualización de los filamentos de Actina gracias a que se une a los filamentos de Actina, impidiendo su despolimerización y por lo tanto promoviendo su estabilización (Cooper, 1987). Comparando imágenes de embriones en el mismo estadio de cierre observamos que el cable de Actina de los mutantes está desorganizado y no llega a acumularse como en los embriones silvestres (Fig. 9). También se observaron defectos similares para el cable de miosina. Para ello se utilizó un *protein-trap* para la cadena pesada de Miosina-II y codificada por el gen *zipper*. Como resultado se ve alterada la acumulación característica en el cable de manera alterna y formando ‘cuentas de rosario’ (Fig. 10).

Respecto al proceso de cierre cremallera en el que intervienen las células más dorsales de la epidermis, se midió tanto el tiempo de inicio como la velocidad de avance de la cremallera (Fig. 11A). En embriones control, el comienzo del cierre en el canto posterior se produce 17 ± 2 min antes que el comienzo del cierre en el canto anterior. En cambio, los agujeros en la región anterior de los embriones mutantes afectan de manera directa al cierre en dicha región e impiden cuantificar dicho proceso. No obstante, para los casos en los cuales no se producía agujero se observa un incremento en el tiempo de aparición del cierre en cremallera anterior, lo cual indica que se trata de una zona sensible a la falta de función de α -Catenina durante la embriogénesis a pesar de no ver defectos evidentes (Fig. 11B).

A continuación, se analizó el cierre en cremallera en la región posterior el cual no está afectado por ningún agujero de manera directa. Como resultado se observó un retraso en el comienzo en el cierre en cremallera posterior en los embriones mutantes de α -Catenina respecto al control. De manera significativa, el cierre en cremallera posterior comienza a los 95 ± 5 y 101 ± 11 minutos para los alelos α -Cat²⁰⁴⁹ y α -Cat⁴²¹,

respectivamente, mientras que para los embriones silvestres comienza a los 73 ± 3 min, una vez realizado el alineamiento temporal (Fig. 11C). Posteriormente, se midió la velocidad relativa del cierre en cremallera posterior. Para lo cual se calculó el tiempo transcurrido en alcanzar una distancia de referencia en el eje Antero-Posterior (AP) una vez iniciado el proceso de cierre en cremallera posterior. Como resultado se obtiene una reducción de la velocidad de cierre en cremallera respecto al control para los embriones mutantes del dominio C-terminal y de manera significativa para los embriones mutantes $\alpha\text{-Cat}^{13}$ (Fig. 11D). Por el contrario, para los embriones mutantes $\alpha\text{-Cat}^1$ se observa que tanto el comienzo como la velocidad del cierre en cremallera posterior son similares embriones silvestres.

Con estos resultados, se concluye que tanto la morfología del cable supracelular de actomiosina como el proceso de cierre en cremallera están afectados en los mutantes de los dominios C-terminal y central de modulación a Vinculina de α -Catenina. Por lo tanto, dichas regiones son importantes en la dinámica de diferentes procesos que regulan la velocidad del cierre, en este caso proveniente de la epidermis lateral. A continuación, cabe preguntarse si la dinámica de las células de la *amnioserosa* también está afectada.

4.2.5. Las proteínas truncadas de α -Catenina no interaccionan con el citoesqueleto de actomiosina.

Una vez observados los defectos en la localización de la actomiosina en el *leading-edge* nos preguntamos si los alelos mutantes de α -Catenina eran capaces de interaccionar con el citoesqueleto de actomiosina. Y, de esta manera, comprender si los defectos observados en la velocidad del cierre dorsal se deben a una bajada en los niveles de α -Catenina exclusivamente o también a la falta de interacción de las proteínas truncadas con el citoesqueleto. Para ello, sobre-expresamos ectópicamente en la *amnioserosa* de embriones mutantes para α -Catenina una forma fosfomimética de la cadena reguladora de Miosina (*sqhDD*). Nos planteamos que el aumento de la contractilidad en la *amnioserosa* de embriones mutantes en los que la adhesión está comprometida, produciría un aumento de los agujeros en el embrión. Como resultado del análisis cuticular observamos que la expresión ectópica de *sqhDD* de manera específica en la

amnioserosa incrementa el fenotipo de agujeros antero-dorsales en embriones α -Cat¹ y α -Cat¹³, pero no tiene un efecto en el fenotipo cuticular de embriones α -Cat²⁰⁴⁹ y α -Cat⁴²¹ (Fig. 12A-B).

Por último, nos preguntamos cómo se desarrollaban *in vivo* los agujeros anteriores en los embriones mutantes que son capaces de interaccionar con el citoesqueleto de actomiosina. En primer lugar, observamos que los embriones silvestre en los que se sobre-expresa ectópicamente *sqhDD* no se produce ningún tipo de rotura, a pesar de presentar un estado más contraído en las células de la *amnioserosa*. En cambio, observamos un empeoramiento de los agujeros anteriores en embriones *sqhDD*; α -Cat¹, que desarrollan agujeros anteriores de tipo severo pero sin llegar a producirse roturas en el interior de la *amnioserosa* (Fig. 12C).

Por lo tanto, estos resultados nos sugieren que los defectos en el enlentecimiento del cierre dorsal observados en los alelos mutantes con el dominio de unión a Actina truncado se deben a que las proteínas mutantes no son capaces de interaccionar con el citoesqueleto de actomiosina tanto a nivel de las células de la *amnioserosa* como en las células epidérmicas del *leading-edge*.

4.3. α -Catenina afecta el comportamiento oscilatorio y contráctil de las células de la *amnioserosa* a lo largo del cierre dorsal.

4.3.1. La amplitud y la duración del ciclo de oscilación están incrementados a lo largo del cierre dorsal en los embriones mutantes de α -Catenina.

Hemos descrito como el enlentecimiento del cierre no estaría siendo consecuencia directa de los agujeros anteriores o de un descenso en el número de delaminaciones, lo cual nos hizo plantear la posibilidad de que la contracción de las células de la *amnioserosa* estuviese también afectada. En particular, nos preguntamos cuál es la contribución de α -Catenina en la regulación del comportamiento oscilatorio y contráctil de las células de la *amnioserosa*.

Con el objetivo de estudiar las oscilaciones del área apical de las células de la *amnioserosa* medimos su frecuencia y amplitud gracias al seguimiento semi-automático de los contornos celulares a lo largo del cierre dorsal, utilizando DE-Cadherina::GFP como marcador apical de la célula (Fig. Sup. 1-5). En embriones silvestres se observa un patrón temporal y estereotipado en el comportamiento oscilatorio de las células de la *amnioserosa* a lo largo del cierre (Blanchard et al., 2010). En la fase temprana, las células de la *amnioserosa* oscilan con una duración del ciclo de 3,5 - 4 minutos y una amplitud del 9 - 10% del radio celular sin producirse una contracción efectiva del tejido. Será a continuación, en la denominada fase lenta cuando se produzca una contracción global del tejido coincidiendo con un descenso tanto en la duración del ciclo de oscilación (2,5 – 3,5 min) como en la amplitud (7 – 9% del radio celular). Finalmente, tras 60-70 min del comienzo de la contracción neta del tejido y coincidiendo con el comienzo del cierre en cremallera posterior, las células de la *amnioserosa* entran en la fase rápida de contracción. En esta fase la duración del ciclo de oscilación desciende hasta los 1,5 min y la amplitud hasta el 5% del radio apical (Fig. 13A-B).

Respecto a los mutantes de α -Catenina, la primera observación es que el patrón temporal para la duración del ciclo de oscilación en embriones α -Cat¹³ se mantiene prácticamente idéntico al de los embriones silvestres. Por el contrario, en embriones α -Cat²⁰⁴⁹ se observa un incremento significativo en la duración del ciclo de oscilación

durante 100 minutos y que corresponde a la fase lenta y rápida de contracción observadas en los embriones silvestres. En embriones α -Cat¹ y α -Cat⁴²¹, también hay un incremento en la duración del ciclo de oscilación respecto al control, aunque éste comienza a ser significativo a partir de los 50 minutos del comienzo de la contracción del tejido, correspondiendo a la fase rápida de los embriones silvestres (Fig. 13A).

En cuanto al otro parámetro que describe el comportamiento oscilatorio, la amplitud de las oscilaciones también está afectada en los embriones mutantes para α -Catenina. Sin embargo, los embriones mutantes α -Cat¹³ tienen nuevamente un patrón temporal y valores de amplitud similares al silvestre. El resto de alelos presentan un incremento de la amplitud, si bien menos significativo que los valores de duración del ciclo. En concreto, para los embriones α -Cat¹ y α -Cat⁴²¹ la amplitud se incrementa a partir de la fase lenta de contracción, mientras que para los embriones α -Cat²⁰⁴⁹ la amplitud aumenta tempranamente y se hace significativa a partir de los 50 minutos (Fig. 13B).

Por lo tanto, de manera general, se observa que en los embriones mutantes para todos los alelos de α -Catenina, excepto para α -Cat¹³, hay un aumento del período de las oscilaciones con respecto a los embriones silvestres para etapas del desarrollo equivalentes. Estos resultados también muestran que este defecto no es una consecuencia de los agujeros anteriores: en los embriones α -Cat¹³ se forman agujeros anteriores muy evidentes, y no hay cambios en el patrón temporal de las oscilaciones, y lo contrario sucede en los embriones mutantes para α -Cat¹. Por lo tanto, nos planteamos que una disminución en los niveles de α -Catenina en las células de la *amnioserosa* o la presencia de una proteína α -Catenina sin el dominio de unión a la Actina, podría ser la causa del aumento en el período de las oscilaciones en el área apical de las células de la *amnioserosa*.

4.3.2. El incremento de la duración del ciclo de oscilación se debe preferencialmente al aumento en el ciclo de expansión.

Los resultados anteriormente descritos muestran cómo para embriones α -Cat¹, α -Cat²⁰⁴⁹ y α -Cat⁴²¹, pero no para α -Cat¹³, la duración del ciclo de oscilación de las células de la AS está afectada mayormente. Estos resultados se refieren al ciclo completo de oscilación, el cual se puede descomponer en su fase de contracción y de expansión

(Fig. 14). De esta forma, un incremento en el periodo de oscilación del área apical puede deberse a un incremento particular de la fase de contracción, de la fase de expansión o de ambas fases. Por lo tanto, nos preguntamos qué situación de las anteriores ocurría en los embriones mutantes de α -Catenina.

Nuestros datos revelan que en todos los embriones mutantes, el incremento en la duración del ciclo se debe mayoritariamente a un mayor aumento de la duración de la fase de expansión. En particular, en los embriones α -Cat²⁰⁴⁹, el incremento observado del ciclo de oscilación correlaciona en su totalidad con un incremento de la fase de expansión durante los 100 minutos en que se produce. Sin embargo, también se produce un aumento de la fase de contracción en los embriones mutantes pero de manera menos significativa respecto a los embriones silvestres (Fig. 14A-B).

A continuación, nos preguntamos cómo era la relación entre el ciclo de contracción y expansión para los mutantes de α -Catenina. Para ello comparamos los valores del ciclo de expansión con los de contracción dentro de cada genotipo. Respecto a los embriones silvestres, hay un predominio en la duración de la fase de expansión sobre la fase de contracción desde el comienzo del cierre dorsal para ir igualándose hacia el final del proceso, lo que correlaciona con el aumento de la contractilidad de las células de la *amnioserosa*. Estas observaciones sugieren que la disminución progresiva del período de expansión sería una forma de estabilizar el estado contraído y por lo tanto estar actuando como “*ratchet*”. En los embriones mutantes para α -Catenina, se observa el mismo comportamiento de predominio de la fase de expansión a lo largo del cierre con independencia de si se produce un incremento o no en cada una de las fases de manera individual (Fig. 14C).

Por lo tanto, estos datos muestran que en los mutantes para α -Catenina, hay un aumento del período de las oscilaciones en el área apical de las células de la *amnioserosa*, que se debe principalmente a un aumento del período de expansión. Un aumento en el período de expansión sugiere un defecto a nivel de la estabilización del estado contraído o del “*ratchet*”.

Un defecto a nivel del “*ratchet*” daría lugar a células que no se contraen correctamente. Por ello, nos preguntamos si en los mutantes de α -Catenina, el

incremento preferencial en la fase de expansión observado produciría defectos en la contracción de las células de la *amnioserosa*. En primer lugar, observamos cómo las células de dichos mutantes desarrollaban una apariencia corrugada (Fig. 15A), lo que sugiere que el perímetro de la célula no es capaz de reducirse de manera normal a lo largo del cierre. La evolución a lo largo del cierre dorsal del área apical y del perímetro de las células de la *amnioserosa* de los embriones mutantes no presenta diferencias con la situación silvestre, excepto en el caso de los embriones mutantes para α -Cat¹ (Fig. Sup. 7). Sin embargo, cuando se cuantifica el cociente entre el perímetro y el área celular, como forma de medir el nivel de corrugado, se observa un aumento ligeramente significativo en los embriones mutantes α -Cat²⁰⁴⁹ y α -Cat⁴²¹, pero no para los embriones α -Cat¹ (Fig. 15B). Estos datos sugieren que la tensión a nivel de las membranas celulares podía estar disminuida.

4.2.3. Los embriones del dominio C-terminal truncado presentan defectos en el desplazamiento máximo de las membranas celulares.

La tensión entre dos células que están en contacto está determinada por la adhesión célula-célula y la tensión generada por la interacción entre las redes contráctiles con la membrana (Lecuit and Lenne, 2007). Para analizar si efectivamente había cambios en la tensión en las células de la *amnioserosa* de los mutantes α -Catenina, utilizamos la técnica de ablación por láser, una metodología que se usa de manera rutinaria para evaluar tensiones celulares (Kiehart et al., 2000, Hutson et al., 2003, Ma et al., 2009, Wells et al., 2014, Fischer et al., 2014).

En concreto, aplicamos la técnica de ablación por láser en las membranas de las células de la *amnioserosa* en su eje AP, y calculamos la velocidad de retraimiento y el desplazamiento máximo de los vértices más próximos a la membrana donde se produce la lesión (Fig. 16A). Debido a que la distribución del desplazamiento de las membranas lo largo del tiempo es exponencial, se considera que las células se comportan como un material visco-elástico donde los vértices de las células están conectados por módulos Kelvin-Voigt, que consisten en la disposición en paralelo de un muelle y un émbolo, representando las propiedades elásticas (E) y viscosas (η) respectivamente (Fig. 16B). Del ajuste exponencial de los datos se obtienen dos

parámetros: el desplazamiento máximo (D) y el tiempo en el que éste se hace constante (T). Y del producto de división entre ambos parámetros se obtiene la velocidad inicial de retraimiento (V). Relacionando las propiedades mecánicas con los parámetros obtenidos se obtienen las siguientes relaciones: $D = \text{tensión} / \text{rigidez}$; $T = \text{viscosidad} / \text{rigidez}$; $V = \text{tensión} / \text{viscosidad}$ (Fig. 16B-C).

En primer lugar, en embriones silvestres observamos cómo la velocidad de retraimiento de los vértices aumenta de manera significativa para estadios tardíos del cierre, sugiriendo un aumento de la tensión del tejido asumiendo que la viscosidad es constante a lo largo del proceso (Fig. 16D). De la misma manera, se produce un aumento significativo en el desplazamiento máximo de los vértices en embriones tardíos, lo que sugiere un aumento de la tensión con respecto a la rigidez (Fig. 16E). Estos resultados concuerdan con los valores de velocidad y desplazamiento publicados anteriormente para las células de la *amnioserosa* (Ma et al., 2009). Además, Machado y colaboradores han establecido un marco biofísico para medir las propiedades mecánicas de las células y han propuesto que a medida que transcurre el cierre dorsal, hay un aumento de la rigidez en el tejido, pero la tensión aumenta más que la rigidez, permitiendo así la contracción apical de las células, lo que coincide con los resultados de ablación por láser aquí presentados (Machado et al., 2014). Esta evolución en las propiedades mecánicas también se refleja en el parámetro T, que disminuye a medida que avanza el cierre dorsal, sugiriendo nuevamente un aumento de la rigidez. (Fig. 16F). Tras los datos obtenidos de nuestro ajuste podemos concluir que tanto la tensión como la rigidez aumentan en la *amnioserosa* a lo largo del cierre dorsal en embriones silvestres, pero la tensión aumenta más que la rigidez.

En los embriones mutantes $\alpha\text{-Cat}^{2049}$, en primer lugar se observa que no hay cambios en la velocidad de retraimiento de los vértices, tanto para estadios tempranos como tardíos respecto a los embriones silvestres. Este resultado sugiere que, contrariamente a lo esperado, no hay cambios en la tensión en el tejido si se asume que la viscosidad no cambia. Además, se observa que hay una disminución del desplazamiento máximo tanto en embriones tempranos como tardíos. Si efectivamente la tensión no cambia, este dato sugiere que hay un aumento de la rigidez en los mutantes α -Catenina. Este

posible aumento en la rigidez se vería también reflejado en el parámetro T , que presenta una disminución en embriones tempranos.

Sin embargo, dado que los valores de ablación por láser no dan lugar a valores de tensión, rigidez y viscosidad absolutos, sino a relaciones entre ellos, existen otras interpretaciones posibles. Por ejemplo, si no asumimos que la viscosidad es constante, otro escenario posible sería que si bien no hay diferencias en la velocidad de retraimiento entre embriones silvestres y mutantes, en estos últimos, habría un aumento o una disminución de ambas propiedades. Si consideramos que hay un aumento de la viscosidad y de la tensión, tendría que haber un aumento de la rigidez aún mayor para dar cuenta de los cambios en T y en D . En cambio, una disminución de la viscosidad y de la tensión, manteniendo la rigidez constante, podría dar cuenta de los resultados obtenidos para T y D .

En resumen, creemos que los experimentos de ablación por láser realizados no son concluyentes. Para estudiar en un futuro el comportamiento mecánico de las células de la *amnioserosa* en mayor profundidad, se podrían hacer ablaciones más precisas que afectaran de manera específica las membranas celulares o la zona medio-apical de las células. También es posible que el modelo Kelvin-Voigt, si bien es adecuado para analizar el comportamiento mecánica de tejidos silvestres, falla a la hora de analizar situaciones mutantes.

4.4. α -Catenina regula la dinámica de los focos de actina y la estabilización de la E-Cadherina.

4.4.1. α -Catenina regula la dinámica de los focos de Actina en las células de la *amnioserosa*.

Durante el cierre dorsal las oscilaciones en el área apical de las células de la *amnioserosa* correlacionan con la actividad transitoria de focos de actomiosina que se ensamblan y des-ensamblan durante el ciclo de oscilación (Blanchard et al., 2010, David et al., 2010). Con estos antecedentes, analizamos la dinámica del citoesqueleto de actomiosina en los alelos mutantes de α -Catenina, en los que se observaron defectos en la contracción y en el comportamiento oscilatorio de las células de la *amnioserosa*. Para ello realizamos películas *time-lapse* de las células de la *amnioserosa* en embriones silvestres y mutantes para α -Catenina que llevaban sGMCA como reportero de la actividad de Actina, durante una ventana temporal de 15 minutos y en la fase lenta de contracción del cierre, cuando los defectos en las oscilaciones comienzan a ser significativos (Fig. 17A). Previamente se ha descrito la co-localización de la Miosina y de la Actina en focos que se ensamblan y desensamblan en la región apical de las células de la *amnioserosa*, con una dinámica similar a lo largo del cierre dorsal (Blanchard et al., 2010, David et al., 2010).

Para analizar la dinámica de los focos de Actina en las células de la *amnioserosa*, medimos manualmente la duración, el intervalo y el ciclo del foco. La duración del foco representa el tiempo de aparición (ensamblaje) y desaparición (des-ensamblaje) de cada foco de Actina. El intervalo consiste en el tiempo de reposo entre focos consecutivos. Y la suma de ambos parámetros constituye el ciclo del foco. Como resultado se obtiene que la duración media del ciclo del foco de Actina se incrementa en las células de la *amnioserosa* para los embriones mutantes α -Cat¹, α -Cat²⁰⁴⁹ y α -Cat⁴²¹ pero no para los embriones α -Cat¹³ (Fig. 17B), correlacionando con los resultados de la duración del ciclo de oscilación, el cual se incrementa de manera significativa para los primeros. De manera interesante, el intervalo de tiempo entre focos de actina consecutivos, está incrementado en todos los alelos, pero de manera más significativa en los embriones mutantes α -Cat²⁰⁴⁹ y α -Cat⁴²¹ (Fig. 17C). Esto nos

sugiere que el incremento en la fase de expansión observado puede ser una consecuencia directa del incremento en el intervalo de tiempo entre foco y foco. Por el contrario, la duración de los focos de actina disminuye para $\alpha\text{-Cat}^{13}$ y $\alpha\text{-Cat}^{421}$, pero no para los embriones $\alpha\text{-Cat}^1$ y $\alpha\text{-Cat}^{2049}$ (Fig. 17D). De esta manera, los resultados en la dinámica de los focos de actina muestran una correlación con el comportamiento oscilatorio de las células de la *amnioserosa*: mientras que en los embriones mutantes $\alpha\text{-Cat}^1$, $\alpha\text{-Cat}^{2049}$ y $\alpha\text{-Cat}^{421}$, el aumento en el intervalo de tiempo entre focos consecutivos daría lugar a un incremento en la duración del ciclo de oscilación de la célula, esto no ocurre con los embriones $\alpha\text{-Cat}^{13}$, donde a pesar de tener un aumento en el intervalo de tiempo entre focos este queda compensado por una reducción en la duración del foco de actina.

Para confirmar que los defectos en los ciclos de Actina son específicos del complejo de adhesión, decidimos analizar esta dinámica en una situación en la que la reducción de α -Catenina fuera aún más fuerte. Para ello, utilizamos el alelo mutante shg^{g317} , que codifica para una DE-Cadherina truncada a la que le falta el dominio de unión a Armadillo, y por lo tanto, imposibilita la interacción de DE-Cadherina con α -Catenina. Este alelo tiene un fenotipo más fuerte que el alelo nulo de DE-Cadherina probablemente debido a un efecto dominante-negativo con la proteína materna (Tepass et al., 1996, Gorfinkiel and Martínez-Arias, 2007).

Las películas *time-lapse* de embriones mutantes shg^{g317} con sGMCA como reportero de la actividad de Actina muestran la existencia de focos de Actina en las células de la *amnioserosa* (Fig. 18A). Estos focos tienen una reducción significativa de la duración media del foco y un aumento significativo del intervalo de tiempo entre focos consecutivos respecto a embriones silvestre. Como resultado, el ciclo medio del foco de Actina se ve incrementado de manera muy significativa (Fig. 18B-D; Tabla S1). Por lo tanto, estos resultados muestran que un mutante para DE-Cadherina que no es capaz de reclutar a α -Catenina a la membrana produce un efecto en la dinámica de los focos de Actina similar a los descritos para la reducción de α -Catenina, pero en mayor magnitud.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que α -Catenina tiene una función en la modulación de la red pulsátil de actomiosina en las células de la *amnioserosa*. En concreto, tendría un papel en la estabilización de los focos de Actina y a su vez en promover la formación de uno nuevo. La dinámica particular de los focos de Actina observada para cada alelo mutante nos sugiere que la interacción entre α -Catenina y los filamentos de Actina y otras proteínas de unión a la actina podría estar afectada de manera diferencial en los distintos alelos.

4.4.2. Defectos en la tasa de recambio (*turnover*) de E-Cadherina en las membranas de las células de la *amnioserosa* de los mutantes de α -Catenina.

Uno de los papeles fundamentales de α -Catenina es la de mantener la formación de la unión adherente (Imamura et al., 1999, Pacquelet and Rorth, 2005, Yonemura et al., 2010, Sarpal et al., 2012). En concreto, en mutantes de α -Catenina a los que les falta el dominio VH1 o VH3, tanto DE-Cadherina como Armadillo no se localizan en la membrana apical del epitelio folicular (Desai et al., 2013). Por lo tanto, analizamos si los niveles de DE-Cadherina estaban afectados en los embriones mutantes α -Catenina. No pudimos detectar cambios significativos en los niveles de DE-Cadherina para las células de la *amnioserosa* en embriones mutantes de α -Catenina, pero sí detectamos cambios en la dinámica de la DE-Cadherina. La unión célula-célula mediada por E-Cadherina sufre un proceso de remodelación en los tejidos durante el desarrollo, donde la estabilidad y la movilidad de las uniones son reguladas por diferentes mecanismos, en los que la dinámica del citoesqueleto de actina juega un papel importante (Cavey et al., 2008).

Para poder medir la dinámica de la DE-Cadherina en las células de la *amnioserosa* a lo largo del cierre dorsal realizamos experimentos de FRAP (*Fluorescent Recovery After Photobleaching*) en embriones con DE-Cadherina::GFP. Como resultado observamos que se produce un descenso de la fracción móvil de la DE-Cadherina según el cierre progresa sugiriendo que se produce una estabilización de las uniones célula-célula en estadios tardíos del proceso (Fig. 18E-F). De manera similar, realizamos experimentos de FRAP en embriones cuyas membranas apicales estaban marcadas con el *protein-trap* de α -Catenina (α -Catenina::YFP), con niveles endógenos de la proteína, viable en

homocigosis y que se localiza de manera normal en la membrana apical . Nuevamente obtuvimos un descenso de la fracción móvil de la proteína en estadios avanzados del cierre (Fig. 18G). Sin embargo, en embriones mutantes $\alpha\text{-Cat}^{2049}$ no se produce el descenso de la fracción móvil de DE-Cadherina::GFP observado en embriones silvestre según progresa el cierre dorsal (Fig. 18G; Fig. S9). Estos resultados muestran que α -Catenina promueve la estabilización de DE-Cadherina al nivel de la unión célula-célula.

Por último, para comprobar si la falta de estabilización de DE-Cadherina podría verse compensada aumentando los niveles de DE-Cadherina o α -Catenina, realizamos experimentos de sobre-expresión en embriones mutantes $\alpha\text{-Cat}^1$ y $\alpha\text{-Cat}^{2049}$. Como resultado, obtuvimos un rescate parcial de los defectos cuticulares tanto para embriones mutantes $\alpha\text{-Cat}^1$ (Fig. 21; Sarpal *et al.*, 2012) como $\alpha\text{-Cat}^{2049}$ (Fig. 21) con la sobre-expresión ubicua de DE-Cadherina. En cambio, obtuvimos resultados diferentes para cada alelo según el tejido, *amnioserosa* o epidermis, y el tipo α -Catenina, sola o fusionada a DE-Cadherina (explicado con más detalle en el Capítulo 7, Fig. 21).

4.5. Vinculina es reclutada dependiendo de tensión en la membrana apical de las células de la *amnioserosa* de manera dependiente e independiente de α -Catenina.

4.5.1 Los niveles de Vinculina se incrementa en las membranas de las células de la *amnioserosa* dependiente de tensión.

Se ha demostrado recientemente que α -Catenina puede actuar como sensor de tensión, transmitiendo la información desde citoesqueleto a las uniones adherentes (Huveneers y de Rooij, 2013). Experimentos realizados en células de mamífero han mostrado como la tensión generada por la actividad de la Miosina induce un cambio conformacional en la α -Catenina que des-enmascara el dominio de unión a Vinculina. La Vinculina, una proteína de unión a Actina, es reclutada a las uniones adherentes y permite la asociación de más filamentos de actina reforzando la adhesión célula-célula (Yao et al., 2014, Yonemura et al., 2010, le Duc et al., 2010) .

En primer lugar, investigamos si la expresión de Vinculina en las células de la *amnioserosa* a lo largo del cierre dorsal depende de tensión. Para ello, generamos una construcción para Vinculina unida a YFP (*UAS-Vinculina::YFP*). La expresión de este reportero en las células de la *amnioserosa* muestra que durante estadios tempranos del cierre dorsal, la Vinculina se localiza de manera generalizada en estas células. Por el contrario, observamos un enriquecimiento en la membrana apical en estadios más tardíos. Para comprobar si dicha localización de la Vinculina depende de tensión, analizamos tanto la situación de aumento como la de bajada de la actividad de Miosina, expresando de manera ectópica en las células de la *amnioserosa* una forma constitutivamente activa de una quinasa (*UAS-ctMLCK*) y de la fosfatasa (*UAS-MbsN300*) que regulan la fosforilación de la cadena ligera de la Miosina-II no muscular. Bajo estas condiciones observamos cómo la localización de la Vinculina ocurre de manera predominante en la membrana en condiciones de aumento de la actividad de Miosina durante todo el cierre dorsal, mientras que la localización de Vinculina es más generalizada cuando la actividad de Miosina se reduce con la fosfatasa de la Miosina-II (Fig. 19A).

Recientemente, se ha generado una nueva herramienta para la observación de Vinculina en vivo (*Vinculina::GFP*), con niveles endógenos de expresión (Klapholz et al.,

2015). A pesar de que los niveles de fluorescencia de Vinculina::GFP son muy bajos en las células de la *amnioserosa* observamos un aumento de los niveles en las membranas en estadios tardíos del cierre dorsal en comparación con etapas mas tempranas del cierre (Fig. 19B). Nuevamente, obtenemos un predominio de los niveles de Vinculina::GFP en la membrana apical de las células de la *amnioserosa*, incluso en estadios tempranos del cierre, cuando se expresa ectópicamente *ctMLCK* (Fig. 19C). Con estos resultados se demuestra que hay un reclutamiento dependiente de tensión de la Vinculina en la membrana apical de las células de la *amnioserosa*.

4.5.2. α -Catenina interacciona genéticamente con Vinculina en el embrión de *Drosophila*.

A continuación, quisimos comprobar si el reclutamiento de Vinculina dependiente de tensión en las células de la *amnioserosa* estaba mediado por la interacción con α -Catenina. Para ello realizamos un ensayo cuticular embrionario donde utilizamos una delección completa de la región codificante para Vinculina ($\Delta Vinc$), que resulta ser viable y no causa ningún fenotipo visible en el adulto. Sin embargo, la delección de Vinculina consigue eliminar totalmente la función residual de un mutante para Talina con defectos parciales en el músculo embrionario, al cual le falta el sitio de unión a Actina pero conserva los sitios de unión a Vinculina (Klapholz et al., 2015). En nuestro caso, las cutículas depositadas por embriones doblemente homocigotos para Vinculina y los diferentes alelos de α -Catenina confirman que existe una interacción genética. El porcentaje de agujeros anteriores severos en las cutículas de $\Delta Vinc; \alpha-Cat^1$, $\Delta Vinc; \alpha-Cat^{13}$, $\Delta Vinc; \alpha-Cat^{2049}$ aumenta de manera significativa cuando comparamos con el correspondiente alelo de α -Catenina sin la delección de Vinculina (Fig. 20A y 20C). Sin embargo, en embriones $\Delta Vinc; \alpha-Cat^{421}$ se observa un menor porcentaje relativo de agujeros anteriores severos y un descenso significativo de los agujeros antero-dorsales.

Estos resultados indican que en algunos alelos mutantes para α -Catenina la actividad de Vinculina es capaz de compensar parcialmente la función de α -Catenina. De manera similar a lo que se ha descrito para la interacción entre Talina y Vinculina, una posible explicación para estos resultados sería que las proteínas mutantes generadas

por los alelos $\alpha\text{-Cat}^{13}$ y $\alpha\text{-Cat}^{2049}$ expusieran un sitio de unión a Vinculina por el que se unirían a esta proteína. Vinculina, a través de su unión a Actina, restauraría (al menos parcialmente) la función de α -Catenina. Curiosamente, esto no pasaría en el alelo mutante $\alpha\text{-Cat}^{421}$, ya que la ausencia de Vinculina no agrava el fenotipo cuticular. Sin embargo, esta explicación no concuerda con el mecanismo de interacción entre α -Catenina y Vinculina descrito en cultivos celulares, ya que $\alpha\text{-Cat}^{2049}$ codifica para una proteína truncada a la cual le falta el dominio de unión a Actina (Fig. 1A) y cuyos niveles relativos medidos por inmunoblot indican que se produce tal truncamiento (Fig. 2A-C). Por otro lado, el alelo $\alpha\text{-Cat}^{421}$ codifica para una proteína truncada en la posición 459 (Fig. 1A), y aunque no hemos sido capaces de localizar la proteína truncada por inmunoblot, el truncamiento removería el dominio putativo de auto-inhibición lo cual expondría de manera constitutiva el dominio de unión a Vinculina. Por todo ello, esperaríamos que $\alpha\text{-Cat}^{2049}$ no fuera capaz de unirse a Vinculina mientras que $\alpha\text{-Cat}^{421}$ sí lo hiciese, pero este no es el caso.

Por lo tanto, proponemos una explicación alternativa que reconcilia nuestros resultados con las observaciones publicadas. Se ha descrito que la Vinculina puede interaccionar con E-Cadherina de manera independiente a α -Catenina en cultivos celulares desprovistos de α -Catenina (Hazan *et al.*, 1997). De esta manera, a pesar de que los embriones mutantes $\alpha\text{-Cat}^{2049}$ no puedan interaccionar con el citoesqueleto de actomiosina (Fig. 12), la Vinculina ejercería parcialmente esta función a través de dicho mecanismo alternativo. Por el contrario, en embriones $\alpha\text{-Cat}^{421}$ la función de Vinculina independiente de α -Catenina no se produciría al estar Vinculina unida a α -Catenina de manera constitutiva.

Esta interpretación predice que tanto en embriones mutantes $\alpha\text{-Cat}^{2049}$ y $\alpha\text{-Cat}^{421}$, Vinculina se localizaría en la membrana apical de las células de la *amnioserosa* de manera constitutiva. En los embriones $\alpha\text{-Cat}^{2049}$, lo haría interaccionando con E-Cadherina independientemente de α -Catenina. En los embriones $\alpha\text{-Cat}^{421}$, lo haría interaccionando de manera constitutiva con α -Catenina. Como resultado observamos que la Vinculina::GFP se localiza en la membrana de embriones tempranos y tardíos para ambos alelos mutantes (Fig. 20B). Asimismo, observamos cómo la localización de la Vinculina en el *leading-edge* está desorganizada en embriones mutantes

comparando con embriones silvestres, y de manera similar a la obtenida para el cable supracelular de actomiosina en los mutantes de α -Catenina (Fig. 9; Fig. 19B). Esta observación indicaría que la distribución de Vinculina en el *leading-edge* estaría más afectada que en las células de la *amnioserosa* en una condición mutante.

Todos estos resultados nos sugieren que hay un reclutamiento de Vinculina dependiente de tensión en la membrana apical de las células de la *amnioserosa* y que puede estar mediada por α -Catenina.

4.6. Mecanismo de regulación de la adhesión y la dinámica del citoesqueleto de actomiosina a través de α -Catenina.

4.6.1. La proteína α -Catenina es requerida en las uniones adherentes tanto en las células de la *amnioserosa* como en la epidermis del embrión.

Tras el rescate parcial obtenido en el análisis cuticular con la expresión ubicua de DE-Cadherina, nos preguntamos como era de necesario el requerimiento de α -Catenina en la membrana apical de las células de la *amnioserosa* durante el desarrollo embrionario de *Drosophila*. La manera en que α -Catenina interacciona con las uniones adherentes ha sido objeto de debate en los últimos años, debido a la diferente afinidad de unirse a la membrana y a los filamentos de Actina como monómero o como dímero respectivamente, siendo ambas excluyentes entre sí (Rimm et al., 1995, Koslov et al., 1997, Pokutta and Weis, 2000, Yamada et al., 2005, Drees et al., 2005, Yonemura et al., 2010). Sin embargo, los últimos indicios proponen que para tener una adhesión más fuerte se requiere la presencia tanto de la α -Catenina monomérica unida a la membrana como de los homo-dímeros de α -Catenina citosólicos en cultivos celulares (Bianchini et al., 2015). Con el objetivo de analizar el requerimiento de α -Catenina como monómero o como dímero durante el cierre dorsal, se analizaron las cutículas embrionarias de los embriones mutantes α -Cat¹ y α -Cat²⁰⁴⁹ sobre-expresando con el sistema *Gal4/UAS* tanto α -Catenina por si sola (*UAS- α -Cat::GFP*) como unida a E-Cadherina (*UAS-E-Cad:: α -Cat*), y que se denominará la forma quimérica. De esta manera, un rescate del fenotipo cuticular con la forma quimérica estaría indicando que α -Catenina está actuando como monómero, mientras que un rescate con *UAS- α -Cat::GFP* y no con la forma quimérica sería indicativo de que α -Catenina está actuando tanto como monómero como dímero. Además, nos preguntamos si dicho requerimiento dependía del tejido en el que se expresan dichos transgenes, utilizando dos *drivers*: *c381-Gal4*, definida como una línea que dirige la expresión de manera específica en la *amnioserosa* desde el estadio embrionario nº12 (Manseau et al., 1997); y *e22c-Gal4*, definida como una línea que se expresa exclusivamente en el ectodermo del embrión a partir del estadio nº10 (Lawrence et al., 1995).

En primer lugar, para comprobar el patrón real de expresión espacial y temporal de ambos drivers utilizamos la técnica *G-TRACE* que combina el sistema *Gal4/UAS* junto con la recombinación *FLP-FRT* y marcadores fluorescentes. Como resultado se obtiene una variación de color en las células que depende de si la expresión se está produciendo a tiempo real o se trata de la de su linaje (Evans et al., 2009). Según las imágenes de microscopía para embriones que expresan el driver *c381-Gal4* observamos una expresión temprana en algunas células de la epidermis más próxima a la *amnioserosa*. Dicha expresión se mantiene durante el cierre dorsal, cuando se produce la expresión en el conjunto de células de la *amnioserosa*. En cuanto al driver *e22c-Gal4*, su expresión comprende la totalidad de las células de la epidermis desde estadios tempranos de la embriogénesis pero también se produce en las células de la Amnioserosa durante el cierre dorsal (Fig. 21A-B). En último término, utilizamos los drivers *c381-Gal4* y *e22c-Gal4* como líneas de expresión mayoritaria en las células de la *amnioserosa* y en la epidermis, respectivamente.

En los ensayos cuticulares de embriones mutantes $\alpha\text{-Cat}^1$ y $\alpha\text{-Cat}^{2049}$, cuando se sobre-expresa con el driver epidérmico tanto la α -Catenina como la quimera, observamos una disminución de la frecuencia de agujeros de tipo severo (Fig. 21C, E). Estos resultados sugieren, por un lado, que el requerimiento de α -Catenina por parte de las células de la epidermis es esencial para no desarrollar lesiones en la región anterior del embrión durante el proceso de invaginación de la cabeza. Además, muestran que no hay diferencias en el rescate obtenido entre la forma quimérica y la forma silvestre (capaz de formar dímeros), sugiriendo que α -Catenina ejerce su función mayoritariamente como monómero (Sarpal et al., 2012, Desai et al., 2013).

Sin embargo, cuando se sobre-expresa de manera específica en la *amnioserosa* cualquiera de los transgenes, observamos un ligero aumento del fenotipo de agujeros en embriones mutantes $\alpha\text{-Cat}^1$ (Fig. 21C y 21E). Estos resultados sugieren que la expresión de α -Catenina de manera específica para el tejido podría estar produciendo un desbalance en la adhesión en la región anterior del embrión produciendo así una mayor frecuencia de agujeros. El mismo experimento realizado en embriones mutantes $\alpha\text{-Cat}^{2049}$ da lugar a resultados similares, con la excepción de que se consigue un rescate de los defectos anteriores cuando se sobre-expresa la quimera de

manera específica en la *amnioserosa* (Fig. 21D y 21F). Este resultado sugiere que la forma quimérica sería capaz de rescatar los defectos en la estabilización de E-Cadherina observados para embriones mutantes $\alpha\text{-Cat}^{2049}$, llegando a los niveles funcionales de la proteína silvestre y sin producir un desbalance de adhesión entre la *amnioserosa* y la epidermis. No obstante, para confirmar esta interpretación sería necesario analizar la dinámica de E-Cadherina en embriones mutantes $\alpha\text{-Cat}^{2049}$ con la sobre-expresión de la quimera de α -Catenina. Y confirmar si hay o no una falta de estabilización de E-Cadherina en las células de la *amnioserosa* en estadios tardíos del cierre dorsal para embriones mutantes $\alpha\text{-Cat}^1$.

Por lo tanto, concluimos que durante la embriogénesis tardía de *Drosophila* es importante que haya un balance en la adhesión regulada por la expresión de α -Catenina en las células de la *amnioserosa* y en la epidermis del embrión.

4.6.2. Antagonismo de la función de α -Catenina y Arp2/3 en las células de la *amnioserosa*.

Diferentes trabajos en células de mamífero han revelado que existe un antagonismo entre α -Catenina y la actividad del complejo Arp2/3, que promueve la formación de redes de actina ramificadas (Goley and Welch, 2006). Del mismo modo, en el embrión de *Drosophila*, también se produce dicha interacción negativa entre α -Catenina y el complejo Arp2/3. Sin embargo, dicha interacción no se produce en el epitelio folicular de *Drosophila* sugiriendo que la competición por los filamentos de actina se produce de distinta manera según el tejido (Sarpal et al., 2012). Se han propuesto distintos mecanismos que explican este antagonismo. Por un lado, se ha propuesto que los homo-dímeros citosólicos de α -Catenina son capaces de unirse a los filamentos de Actina e impedir la unión de las proteínas del complejo Arp2/3. Por otro lado, como mecanismo alternativo se ha descrito que la proteína del síndrome Wiskott–Aldrich (WASp) que actúa como regulador positivo de la actividad del complejo Arp2/3 (Higgs and Pollard, 2001, Kurisu and Takenawa, 2009), promueve la endocitosis de E-Cadherina (Leibfried et al., 2008), por lo que la falta de la actividad de este complejo, aumentaría los niveles de E-Cadherina en la membrana, y por lo tanto podría antagonizar la falta de α -Catenina.

Con el objetivo de estudiar si existe un antagonismo entre α -Catenina y el complejo Arp2/3 en las células de la *amnioserosa*, se sobre-expresó en este tejido una forma de la proteína WASp, un regulador positivo del complejo Arp2/3, que se une a la membrana (*UAS-WASp-Myr*) y que actúa como una forma constitutivamente activa. La sobre-expresión de esta forma de WASp específicamente en la *amnioserosa* con el driver *c381-Gal4* produce roturas muy visibles en el tejido (Fig. 22A). Si la sobre-expresión se hace con un driver de expresión más restringida como el *prd-Gal4*, cuyo patrón es en franjas que recorren la epidermis y la *amnioserosa* en el dominio *paired* del embrión (Brand and Perrimon, 1993), se observa que las células de la *amnioserosa* son más grandes y no se contraen normalmente (Fig. 22B). Por lo tanto, la sobre-expresión de WASp-Myr en la *amnioserosa* produce defectos en la contractilidad y/o adhesión celular., y proporciona un sistema en el cual poder estudiar la interacción entre WASp y α -Catenina.

En primer lugar, investigamos la posibilidad de que la sobre-expresión de la forma activada de WASp estuviera produciendo las roturas por una activación de la endocitosis de DE-Cadherina. Para ello, sobre-expresamos conjuntamente con WASp-Myr, la línea DE-Cadherina específicamente en la totalidad de células de la *amnioserosa* (*c381-Gal4*) o en un número más reducido (*paired-Gal4*). También expresamos en todo el embrión haciendo uso del transgen ubi-DE-Cadherina (datos no mostrados). En ningún caso observamos un rescate de las roturas de la *amnioserosa*, o del tamaño de las células de la *amnioserosa* (Fig. 22A-B), sugiriendo que los efectos de la sobre-expresión del WASp-Myr no se deben a problemas en los niveles de DE-Cadherina.

En segundo lugar, testamos la hipótesis de que los efectos de la sobre-expresión de la forma activada de WASp fueran debidos a una competición con la α -Catenina por la interacción con los filamentos de Actina. Razonamos que la forma activada de WASp podría estar promoviendo la formación de redes de Actina ramificadas e impidiendo que la Actina interaccione con la α -Catenina para así promover la formación de focos y la contracción apical. En este caso, el aumento de los niveles de α -Catenina en una situación de sobre-expresión de WASp, re-establecería el balance entre ambas proteínas y se produciría un rescate de las roturas y/o de la contracción apical. Sin

embargo, observamos que la sobre-expresión de α -Catenina junto con la de WASp-Myr, no produce mejora el fenotipo de sobre-expresión de WASp (Fig. 22A-B).

Nos surgió la duda de que el fenotipo observado para la forma constitutivamente activa de WASp-Myr fuera imposible de revertir. Por ello sobre-expresamos una construcción de WASp silvestre que aumenta los niveles de proteína y produce un aumento del tamaño de las células de la *amnioserosa* cuando se dirige su expresión con la línea específica de la *amnioserosa*, sin llegar a producir roturas en este caso (Fig. 22D-E). En tales condiciones tampoco se observa un rescate del tamaño de las células de la *amnioserosa* (Fig. 22C), tanto cuando se sobre-expresa conjuntamente con α -Catenina como cuando se sobre-expresa conjuntamente con el ARNi para α -Catenina.

Con estos resultados sugerimos que no se produce ningún tipo de interacción positiva entre WASp y los componentes del complejo de adhesión, lo que sugeriría que durante el cierre dorsal no ocurre el mecanismo de competición antagonista entre α -Catenina y el complejo Arp2/3 por la polimerización de los filamentos de actina o defectos en la endocitosis de E-Cadherina.

4.7. Estudio de la localización y función de Filamina y α -Actinina durante los procesos morfogénéticos del cierre dorsal y de la invaginación del mesodermo de *Drosophila*.

4.7.1. Localización y función de Filamina y α -Actinina en las células de la *amnioserosa* durante el cierre dorsal de *Drosophila*.

Dadas las diferencias descritas para las propiedades del citoesqueleto dependiendo de las proteínas de unión a Actina que intervienen, nos preguntamos en qué medida la actividad oscilatoria y contráctil de las células de la *amnioserosa* está regulada por la actividad de los *crosslinkers* Filamina y α -Actinina .

En primer lugar, observamos una diferente localización de ambas proteínas en las células de la *amnioserosa*. Las tinciones de embriones en cierre dorsal mostraron que α -Actinina tiene una distribución generalizada en el citosol, relativamente enriquecida en la membrana apical, y sin co-localizar con los focos de Miosina (Fig. 23A). Mientras, los embriones marcados con el *protein-trap* de Filamina/Cheerio mostraron una localización en las membranas de las células y, de manera interesante, en forma de focos que co-localizan tanto con los de Miosina como los de Actina (Fig. 23B-C). Por otro lado, ambas proteínas se localizan en el *leading-edge*. De manera particular, la α -Actinina se distribuye alternando con la localización en ‘cuentas de rosario’ característica para la Miosina, y de manera similar a la descrita en las uniones adherentes de células de explantes del órgano de Corti de mamífero (Ebrahim et al., 2013).

Debido a la diferente localización de la Filamina y la α -Actinina observada en las células de la *amnioserosa* nos preguntamos cuál era la función de ambas proteínas durante el cierre dorsal. Previamente, se ha descrito que tanto la Filamina como la α -Actinina son requeridas para la organización del citoesqueleto durante la ovogénesis de *Drosophila* (Robinson et al., 1997, Li et al., 1999, Sokol and Cooley, 1999, Wahlstrom et al., 2004, Wahlstrom et al., 2006). Además, alterando la función de α -Actinina se acelera el proceso de contracción durante la citoquinesis en células de mamífero (Mukhina et al., 2007). Asimismo, se ha propuesto que la Filamina actuaría en un modelo de mecanotransducción mediado por fuerza durante el proceso de adhesión focal en cultivos celulares (Nakamura et al., 2014).

En nuestro caso, no obtuvimos resultados concluyentes al interferir la función de estas proteínas utilizando dos técnicas para la bajada de función. En primer lugar, usamos la técnica del ARNi para Filamina y α -Actinina. Sin embargo, no obtuvimos ningún fenotipo tras usar la línea *Gal4* específica de la *amnioserosa*. Como método alternativo, utilizamos la técnica del *deGradFP* que actúa degradando las proteínas de manera específica a través de la maquinaria del proteosoma tras reconocer el GFP o YFP utilizado como marcador (Caussinus et al., 2012). Del mismo modo, no conseguimos ningún defecto del cierre dorsal tras usar dicha técnica de manera específica en la *amnioserosa* con los *protein-traps* de Filamina (*Cheerio::YFP*) y α -Actinina (*Actinin::GFP*). De hecho, no obtuvimos ninguna bajada de la señal de la GFP o YFP, lo cual es explicado por los autores de la técnica para los casos en que el marcador fluorescente permanece ‘enmascarado’ dentro de los complejos proteicos o que las propias enzimas que regulan el proceso de des-ubiquitinación reduzcan la eficiencia del proceso (Caussinus et al., 2013).

Con estos resultados, para descartar que no sólo se trata de un problema técnico sino también de redundancia funcional de los *cross-linkers* o de robustez del cierre dorsal, nos planteamos estudiar la Filamina y α -Actinina durante la invaginación del Mesodermo de *Drosophila*.

4.7.2. Localización y función de Filamina y α -Actinina en las células del surco ventral durante la invaginación del Mesodermo de *Drosophila*.

Durante la gastrulación, las células ventrales del embrión de *Drosophila* reducen su área apical facilitando la formación del surco ventral y la invaginación del futuro mesodermo. La reducción del área es pulsátil y está dirigida por la actividad contráctil del citoesqueleto de actomiosina, que está coordinada temporalmente por los factores de transcripción Snail y Twist (Martin et al., 2009).

En primer lugar miramos la localización de Filamina y α -Actinina en las células del surco ventral. Las tinciones para α -Actinina y el *protein-trap* de Filamina/Cheerio mostraron una localización sub-celular a nivel de las membranas para ambas proteínas (Fig. 24A-B). Sin embargo, encontramos diferencias cuando comparamos con la distribución de Miosina. Solamente la Filamina estaba enriquecida apicalmente

durante la invaginación del futuro mesodermo, en las mismas regiones que Miosina (Fig. 24C). De manera interesante, los resultados de la localización de Filamina y α -Actinina en las células del surco ventral son consistentes con los obtenidos durante el cierre dorsal y nos planteamos estudiar su función durante la invaginación del futuro mesodermo.

Debido a que la gastrulación ocurre al comienzo de la embriogénesis, utilizamos líneas *Gal4* maternas para dirigir la expresión del ARNi para Filamina y α -Actinina. La técnica *maternal-Gal4>UAS-shRNA* se usa de manera efectiva para el silenciamiento de genes durante la oogénesis de *Drosophila* (Ni et al., 2011). No obstante, los *shRNA* proporcionados en el embrión desde la línea germinal no son muy efectivos en interaccionar con los transcritos que se generan en el cigoto, debido a la transición materno-zigótica (MZT) donde el ARN mensajero (mRNA) de origen materno es degradado (Tadros and Lipshitz, 2009). Sin embargo, cuando la proteína Gal4 se proporciona desde la madre sí que resulta ser más eficaz activando la expresión zigótica de las líneas *UAS-shRNA* durante la embriogénesis medio-temprana ya que no serían degradadas en la transición MZT (Staller et al., 2013), M&M para explicación cruces. Para *UAS- α -Actinina^{shRNA}* utilizamos la condición experimental más fuerte y que consiste en utilizar dos líneas maternas (*Mat15-Gal4* y *Mat67-Gal4*) a 27°C. Como resultado obtuvimos que los embriones desarrollaban la gastrulación de manera normal (Fig. 24D). En cuanto a *UAS-Filamina^{shRNA}*, bajo las mismas condiciones experimentales, las hembras no eran capaces de depositar embriones viables, posiblemente debido al importante papel descrito para la Filamina durante la oogénesis (Sokol and Cooley, 2003). Como alternativa, usamos una condición más débil, dirigiendo una única línea materna (*Mat67-Gal4*) a 25°C. Como resultado, vimos un fenotipo sutil para algunas células ventrales, las cuales desarrollaban un mayor tamaño celular pero acababan invaginándose con normalidad (Fig. 24D).

A continuación, y dada la baja efectividad con las líneas maternas, realizamos experimentos de micro-inyección de ARN de doble cadena (*dsRNA*) en embriones de estadios previos a la gastrulación con marcadores para las membranas y Miosina. Las imágenes de confocal revelan que para embriones micro-inyectados con el *dsRNA* contra α -Actinina se alteraba la contracción apical de las células ventrales,

produciendo una deslocalización de la Miosina y un aumento del tamaño celular (Fig. 24E). Sin embargo, no obtuvimos ningún fenotipo cuando el *dsRNA* contra Filamina fue inyectado en embriones tempranos.

Con estos resultados, sugerimos que tanto la Filamina como la α -Actinina tienen ambos un papel en modular el comportamiento contráctil de las células ventrales del futuro mesodermo. Sin embargo, encontramos defectos en la forma en un número reducido de células. No sabemos si esto se debe a la imposibilidad de interferir completamente con la función de estas proteínas, o si los fenotipos sutiles que se observan se deben a la redundancia y/o robustez de los procesos celulares implicados en la contracción apical.

5. DISCUSIÓN

Cómo las fuerzas contráctiles generadas por el citoesqueleto de actomiosina son transmitidas a la membrana celular a través de los sistemas de adhesión para generar la contracción apical y otros cambios celulares es una pregunta fundamental en el campo de la morfogénesis. Para abordar esta cuestión hemos analizado el papel de α -Catenina, una proteína que actúa principalmente como nexo de unión del complejo Cadherina-Catenina a los filamentos de Actina, durante el cierre dorsal de *Drosophila*. Si bien la función de α -Catenina ha sido ampliamente estudiada en sistemas de cultivos celulares, su función en el contexto de un proceso morfogénético dinámico no había sido explorado. Este trabajo muestra que α -Catenina regula la contracción apical de las células de la *amnioserosa* promoviendo y estabilizando la contracción del citoesqueleto de Actina localizado en la región medio-apical de las células. Además, α -Catenina estabiliza la molécula E-Cadherina a nivel de las membranas, sugiriendo que la actividad de las redes de citoesqueleto en la región medio-apical regula la estabilidad de las uniones. Por último, nuestros resultados sugieren que α -Catenina está involucrada en el reclutamiento dependiente de tensión de Vinculina en la membrana apical de las células de la *amnioserosa*. Para el desarrollo de este trabajo hemos utilizado un enfoque similar al de multitud de trabajos en el campo de la biología del desarrollo, donde el uso de **técnicas de adquisición de imágenes in vivo combinado con el análisis cuantitativo** permite el conocimiento de los detalles moleculares y celulares durante la embriogénesis (Blanchard et al., 2009, Escudero et al., 2011, Zulueta-Coarasa et al., 2014, Pantazis and Supatto, 2014).

5.1. Función y conservación de los dominios de unión a los filamentos de Actina y modulación de Vinculina durante los procesos de morfogénesis.

En esta tesis doctoral hemos analizado una serie alélica de α -Catenina con el objetivo de estudiar la función de los dominios de unión a los filamentos de Actina (VH3) y modulación de Vinculina (VH2) durante el cierre dorsal. Uno de los alelos estudiados, el alelo α -Cat¹³, tiene una mutación puntual que sustituye una Valina altamente conservada en posición 851, por Metionina (Fig. R1A). Los embriones mutantes para este alelo presentan fenotipos cuticulares similares a los embriones mutantes para el

alelo nulo, sugiriendo que la Valina 851 es un aminoácido fundamental para la función de α -Catenina. Tanto la Valina como la Metionina corresponden al grupo de aminoácidos apolares e hidrofóbicos, determinado por la similitud del grupo R de sus cadenas peptídicas laterales. Sin embargo, solo las cadenas laterales de la Valina tienden a agruparse entre sí en las proteínas, estabilizando las estructuras de las que forman parte a través de interacciones hidrofóbicas (Nelson y Cox, *Principios de Bioquímica*, 6ª ed.). Por este motivo, postulamos que la sustitución de la Valina comprometería la estabilización de la proteína, quedando afectada la región C-terminal de α -Catenina. La Valina en la posición 851 está conservada en humanos, ratón, pez cebra y *Xenopus*, pero en *C. elegans* dicha posición está ocupada por la Isoleucina (Fig. R1B). Sin embargo, las cadenas laterales de la Isoleucina también tenderían a agruparse con las de la Valina y por lo tanto esperaríamos que la función estuviera también **conservada**. En este mismo sentido, un análisis mutacional realizado en *C. elegans* ha identificado otra Valina (V802) en la región C-terminal de α -Catenina esencial para la asociación de α -Catenina con los filamentos de Actina. La Valina que está mutada en el alelo α -Cat¹³ estaría localizada en el mismo dominio que la Valina 802 de la proteína de *C. elegans*, lo que apoya la idea de que la región que comprende estos dos aminoácidos facilita la unión con la Actina, e incluso se ha propuesto que podría promover la formación de filamentos de Actina (Maiden et al., 2013).

Embriones mutantes para el alelo mutante α -Cat¹³ depositan cutículas con los mismos defectos que el resto de embriones mutantes para los demás alelos, reflejo de los defectos en la región anterior (Fig. R4). Sin embargo, el análisis cuantitativo del comportamiento oscilatorio y contráctil de las células de la *amnioserosa* y de la dinámica del citoesqueleto de Actina muestra que los defectos a nivel sub-celular y celular son los más leves (Fig. R13-14, 17), sugiriendo que la proteína mutante para el alelo α -Cat¹³ es la menos afectada. Estos resultados muestran que el requerimiento de α -Catenina en la cresta dorsal es mayor que en la *amnioserosa*. Curiosamente, en las películas *in vivo* de los embriones α -Cat¹³, hemos observado la aparición de roturas a nivel de la región anterior que son incluso más fuertes que en los embriones mutantes para los otros alelos (Fig. S1-5), lo que contrasta con la idea de que esta proteína sería

la menos afectada. Una explicación para esta observación es que en los embriones α -Cat¹³, estas roturas son más fuertes porque la *amnioserosa* sigue contrayéndose normalmente y “tira” de una cresta dorsal muy debilitada. De esta manera, se produciría un desequilibrio mecánico entre la región anterior del embrión y la *amnioserosa* dando lugar a las roturas. En los embriones mutantes para los otros alelos, la contracción de la *amnioserosa* también estaría afectada, por lo que el desequilibrio mecánico sería menor y las roturas serían menos fuertes.

Los alelos α -Cat²⁰⁴⁹ y α -Cat⁴²¹ en cambio tienen deleccionada la región C-terminal de la proteína. Los embriones mutantes para estos alelos tienen defectos en la cutícula similares a los de los otros alelos, pero los defectos a nivel celular y sub-celular son más pronunciados. Nos preguntamos si este aumento de la severidad de los defectos se debe a una función aberrante de las **proteína truncada** o a un mayor descenso de los niveles de α -Catenina de origen materno, comparando con los embriones mutantes nulo (Fig. R3). Los embriones α -Cat²⁰⁴⁹ y α -Cat⁴²¹ presentan niveles similares de α -Catenina de tamaño normal (alrededor de un 20-30% con respecto a los niveles en embriones silvestres), por lo que si los fenotipos observados en estos embriones se debieran solo a la bajada de los niveles de proteína materna, estos deberían ser muy similares. Sin embargo, los fenotipos analizados de los embriones α -Cat²⁰⁴⁹ y α -Cat⁴²¹ presentan varias diferencias. Por un lado, la dinámica de Actina en los embriones mutantes α -Cat⁴²¹ es la que está más afectada, presentando una menor duración de los focos de Actina y un mayor intervalo de tiempo entre foco y foco (Tabla S1). Por otro lado, en los experimentos de interacción con Vinculina, se produce una interacción genética con todos los alelos mutantes salvo con α -Cat⁴²¹ (Fig. R20). Estos resultados muestran que existen diferencias en los fenotipos desarrollados por los alelos α -Cat²⁰⁴⁹ y α -Cat⁴²¹, lo que nos sugiere que los defectos específicos de cada alelo mutante se deben no sólo a un descenso de los niveles de α -Catenina de origen materno sino también a la presencia de las proteínas α -Catenina truncadas, que son distintas en ambos alelos.

5.2. Defectos autónomos en la contracción apical de las células de la *amnioserosa* en los embriones mutantes para α -Catenina.

De manera interesante, el patrón temporal de las oscilaciones en el área apical se ve afectado en los mutantes de manera independiente a los defectos descritos en la región anterior. En concreto, como ya hemos comentado, los embriones mutantes α -Cat¹³ exhiben defectos muy severos en la epidermis anterior según las imágenes *in vivo*, sin embargo no tienen afectada ni la amplitud ni la duración del ciclo de las oscilaciones. En cambio, en los embriones mutantes α -Cat²⁰⁴⁹ y α -Cat⁴²¹ las células de la *amnioserosa* muestran un incremento del periodo de las oscilaciones debido a que se produce un aumento de manera preferencial en el ciclo de expansión (Fig. R13). Trabajo reciente del laboratorio ha demostrado que no es el período absoluto de las oscilaciones el que determina el estado contráctil de las células de la *amnioserosa* sino la duración relativa de los ciclos de expansión y contracción (Duque y Gorfinkiel, 2016). Por lo tanto, los resultados obtenidos para los embriones mutantes de α -Catenina sugieren que el incremento preferencial en la fase de expansión daría lugar a que las células no se contraen correctamente.

Los defectos observados en las oscilaciones del área apical de las células de la *amnioserosa* podrían ser consecuencia directa de los defectos observados en el cable supracelular de actomiosina (Fig. R9-10), el cual actuaría a modo de *ratchet* externo, restringiendo de manera progresiva la fase de expansión (Solon et al., 2009). Sin embargo, otros trabajos han demostrado que el mecanismo que estabiliza el estado contráctil de las células estaría actuando internamente a nivel celular. En primer lugar, embriones mutantes en los cuales la formación del cable está alterada muestran un patrón normal de oscilación de las células de la *amnioserosa* (Blanchard et al., 2010). En segundo lugar, eliminando físicamente la curvatura del *leading-edge* y el proceso de cierre en cremallera, no se perturba el comportamiento oscilatorio y contráctil de la *amnioserosa* (Wells et al., 2014). En tercer lugar, un modelo biofísico del cierre dorsal en el que se explora la posible contribución de un *ratchet* externo (el cable supracelular de Actina) o de uno intracelular, sugieren que el *ratchet* celular interno tiene un papel más importante (Wang et al., 2012a). Finalmente, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que el incremento de la fase de expansión podría ser

consecuencia del incremento en el intervalo de tiempo entre focos de Actina consecutivos (Fig. R17C).

Aunque no se puede descartar que una señal mecánica originada en el *leading-edge* esté promoviendo la formación de los focos de actomiosina, los resultados aquí presentados favorecen la idea de que el complejo de adhesión Cadherina-Catenina tiene un **papel regulador** de las oscilaciones de actomiosina. En concreto, el complejo de adhesión promovería la aparición de los focos de actomiosina y estos a su vez promoverían la estabilización de la Cadherina-Catenina al nivel de la membranas. De esta manera la unión adherente no sólo serviría como nexo de unión con el citoesqueleto sino que también regularía de manera activa el aparato contráctil (Lecuit and Yap, 2015). En concreto, el complejo de adhesión Cadherina-Catenina participa en la coordinación de los niveles de la proteína Rho durante la citoquinesis de células de mamífero en cultivo, regulada por su activador GEF e inactivador GAP (Ratheesh et al., 2012). De hecho, uno de los efectores de la vía de Rho, la quinasa ROCK, se asocia con E-Cadherina en las uniones célula-célula a través de la catenina p-120 (Smith et al., 2012). En nuestro caso, dado que los embriones mutantes para proteínas con el dominio C-terminal truncado no interaccionan con el citoesqueleto de actomiosina, pensamos que la regulación de la red del citoesqueleto medio-apical por α -Catenina se debe a defectos en el mecanismo de unión de α -Catenina a los filamentos de Actina.

Por último, varios modelos teóricos biomecánicos de las oscilaciones de actomiosina sugieren que un descenso en la frecuencia de las oscilaciones está asociado con un descenso de la tensión generada por la unión entre el citoesqueleto de actomiosina y la membrana (Gorfinkiel, 2016). En dicho contexto la predicción sería que habría un descenso de la tensión al nivel de las membranas en los embriones mutantes para α -Catenina. Y, de acuerdo con ese argumento, en las células de la banda germinal de *Drosophila*, que también exhiben un comportamiento oscilatorio para la actomiosina, una reducción en los niveles de α -Catenina o E-Cadherina reduce la **tensión** del tejido (Levayer and Lecuit, 2013). Sin embargo, los experimentos de ablación por láser realizados en esta tesis no pudieron detectar diferencias en la velocidad inicial de retraimiento de las vértices en contacto directo con las membranas de la lesión en embriones mutantes para α -Catenina (Fig. R16), sugiriendo que los cambios en tensión

son muy sutiles bajo las condiciones realizadas o que el descenso en la frecuencia de las oscilaciones en el área apical de las células no tiene relevancia significativa en la tensión del tejido. Para resolver este problema, se podría realizar ablaciones más precisas, en las que la zona de rotura sea más pequeña, enfocando únicamente las membranas celulares, y no toda la región medio-apical como hemos hecho en esta tesis.

5.3. Coordinación entre las células de la *amnioserosa* durante el cierre dorsal.

Una pregunta importante durante la morfogénesis es cómo la contracción apical generada a nivel de cada célula se transmite y coordina a lo largo de todo el tejido. En este sentido α -Catenina sería una molécula clave junto con E-Cadherina al localizarse en las uniones intercelulares. Una evidencia que sugiere la existencia de la comunicación intercelular en la *amnioserosa* es la mayor probabilidad de que un foco de Actina se forme cerca del lugar donde el foco de otra célula vecina se ha desensamblado previamente (David et al., 2010). Además, experimentos en los que se perturba genéticamente la actividad de la GTPasa Rho, o con la técnica biofísica de ablación por láser se perturban estructuras del citoesqueleto en las células de la *amnioserosa* de manera individual dentro del tejido, y de esta manera impidiendo que oscile o induciendo una contracción prematura, la actividad oscilatoria en el área apical y la dinámica de la Miosina de la célula vecina se ve alterada (Saravanan et al., 2013). Recientemente, un trabajo realizado en las células ventrales del futuro mesodermo de *Drosophila* muestra que las células se contraen más eficazmente cuando están rodeadas de células vecinas que también se contraen, e incluso, células contrayéndose tienden a promover eventos de contracción en las células vecinas que no se estaban contrayendo sugiriendo un mecanismo de cooperación de las células dentro del tejido (Xie and Martin, 2015). Con estos antecedentes, sería interesante comprobar la función de α -Catenina en promover la coordinación de la contracción apical en el tejido, no sólo por su unión física a las membranas si no por su capacidad como mecano-transductor de la actividad contráctil del citoesqueleto de actomiosina. Para ello se podría estudiar si en los embriones mutantes para α -Catenina los focos de Actina se forman preferencialmente cerca de donde se ha desensamblado un foco o si su comportamiento tiende a ser más aleatorio. De manera complementaria, sería

interesante identificar la distribución espacial de la dinámica de los focos, para analizar si existen patrones supra-celulares que indiquen un comportamiento coordinado y estudiar si esos patrones están afectados en los mutantes para α -Catenina. Para ello, sería necesario implementar métodos automatizados para el seguimiento de los focos de Actina y poder así analizar la duración, velocidad y dirección de cientos de focos a lo largo de todo el tejido, lo que permitiría detectar posibles patrones y tendencias en el comportamiento de los mismos.

5.4. Interacción de α -Catenina con proteínas que regulan la adhesión.

La proteína α -Catenina es una proteína multi-dominio que interacciona con una variedad de otras proteínas para así regular la interacción del citoesqueleto a la membrana celular y la adhesión. Una interacción importante que se ha observado en células en cultivo y que puede ser de relevancia durante la morfogénesis es la interacción entre α -Catenina y **Vinculina**. Nuestros resultados sugieren que las distintas proteínas mutantes de la serie alélica de α -Catenina interaccionan de manera diferente con Vinculina (Fig. R20) y son consistentes con que la proteína α -Cat²⁰⁴⁹ no se uniría a Vinculina, ya que no es capaz de interaccionar con el citoesqueleto de actomiosina y por lo tanto no sería capaz de abrir el VBS, y la proteína α -Cat⁴²¹ se uniría de manera constitutiva a Vinculina. Para confirmar esta interpretación, sería necesario analizar si efectivamente las proteínas mutantes para α -Catenina se unen a Vinculina de manera diferencial, realizando ensayos de co-inmunoprecipitación en embriones mutantes para α -Catenina, con especial interés en el alelo α -Cat⁴²¹.

En células de mamífero en cultivo, se ha descrito que un mutante de α -Catenina que une constitutivamente a Vinculina refuerza las uniones adherentes y estabiliza E-Cadherina en experimentos de FRAP. Sin embargo, esta forma mutante de la proteína no es capaz de remodelar las uniones célula-célula en un ensayo de recuperación de heridas (Yonemura et al., 2010), sugiriendo que si bien un aumento constitutivo de Vinculina a nivel de las membranas refuerza la adhesión, no es capaz de sostener la remodelación dinámica de las mismas. De manera similar, nuestros resultados muestran que los embriones α -Cat⁴²¹ son los que tienen el fenotipo más fuerte en la dinámica de los focos de Actina, lo que sugiere que la unión constitutiva de Vinculina a

α -Catenina en el alelo α -Cat⁴²¹ no sería capaz de rescatar la dinámica del citoesqueleto. Sin embargo, no hemos realizado experimentos de FRAP en estos embriones, lo que sería importante para ver si hay una mayor estabilización de E-Cadherina en las membranas dependiente de la unión constitutiva de Vinculina a α -Catenina. Además, nuestros datos genéticos sugieren que existe una actividad de Vinculina capaz de compensar parcialmente la función de α -Catenina. Esta hipótesis predice que una sobre-expresión de Vinculina en fondos mutantes para los distintos alelos produciría un rescate de los fenotipos cuticulares, que sería más fuerte en el alelo α -Cat²⁰⁴⁹.

Por último, hemos encontrado que Vinculina se recluta a la membrana apical de las células de la *amnioserosa* de manera dependiente de tensión (Fig. R19). No sabemos si este reclutamiento es dependiente de α -Catenina, pero la observación de que en los embriones mutantes α -Cat²⁰⁴⁹ y α -Cat⁴²¹ hay niveles altos de Vinculina en la membrana apical desde estadios tempranos del cierre dorsal sugiere que sí. Por lo tanto, postulamos que en la *amnioserosa* existe un **módulo mecano-sensible** que responde a la tensión generada por la Miosina, y en el que estarían implicadas α -Catenina y Vinculina. El reclutamiento de Vinculina a las uniones celulares es un paso esencial en la formación de la barrera trans-epitelial y en proteger las uniones de las posibles roturas durante los procesos de remodelación celular (Huveneers and de Rooij, 2013, Twiss et al., 2012). Recientemente, se ha demostrado que Vinculina modula el ensamblaje de la Actina dependiente de tensión a nivel de las uniones celulares a través de la interacción con las proteínas del complejo Mena/Vasp (Leerberg et al., 2014). En la *amnioserosa* existe una rápida remodelación de las uniones durante los estadios tardíos de cierre dorsal, tejido en el que va incrementando de manera progresiva la contracción de actomiosina. Por ello sería muy interesante estudiar si diferentes módulos mecano-sensibles, incluyendo Vinculina, tienen un papel en mantener la integridad epitelial de la *amnioserosa* a lo largo del proceso de cierre dorsal.

De manera similar a α -Catenina, la **Talina** es una proteína multi-dominio que actúa como nexo de unión entre el citoesqueleto de actomiosina y, en este caso, la matriz extracelular a través de su unión a Integrinas. La Talina es capaz de interaccionar con

diferentes proteínas de unión a Actina, entre ellas la Vinculina, con la que interacciona de manera diferente según el tejido y momento del desarrollo. Durante la GBR la Vinculina es necesaria para mantener la adhesión de Talina a la membrana en mutantes a los que ha sido deleccionado el dominio principal de unión a Integrinas. Mientras que en el músculo embrionario y en el ala de *Drosophila*, la Vinculina es capaz de mantener parcialmente la función de Talina gracias a su interacción con los filamentos de Actina en mutantes a los que ha sido deleccionado el dominio de unión a actina (Klapholz et al., 2015). Durante el cierre dorsal, se produce un enlentecimiento del proceso como resultado de alterar la función auto-inhibitoria de la Talina (Ellis et al., 2013). Por lo tanto, resultaría interesante analizar la interacción de Vinculina con Talina en la región basal de las células de la *amnioserosa*, de manera que podría haber un requerimiento diferencial de Vinculina en el proceso del cierre dorsal dependiendo de la localización sub-celular.

Recientemente, se ha identificado un sitio de **fosforilación** de α -Catenina localizado en una región estructuralmente flexible entre el dominio VH2 y el dominio de unión a Actina, que se requiere para la función normal de α -Catenina durante el desarrollo y la migración colectiva de células. Expresando una forma fosfomimética de α -Catenina se produce una migración más rápida y de manera más coordinada en un ensayo de recuperación de heridas en células de mamífero en cultivo, y por el contrario, expresando una forma no-fosforilable se muestran defectos en la adhesión intercelular (Escobar et al., 2015). Por lo tanto, sería muy interesante investigar si la fosforilación de α -Catenina regula la contractibilidad y la adhesión en las células de la *amnioserosa*. El alelo mutante α -Cat421 (Q459*) tiene deleccionado la región específica descrita para la fosforilación de α -Catenina (T645) en *Drosophila*, mientras que no está deleccionado en el alelo α -Cat2049 (Q668*). Por ello, sería interesante comprobar bioquímicamente si ambos alelos mutantes podrían o no fosforilarse.

Además de las cadherinas, existe una segunda clase de proteínas transmembrana, las nectinas, en las uniones adherentes. Experimentos realizados en cultivos de células de mamífero sugieren que el complejo Nectina-Afadin tiene una actividad similar al complejo Cadherina-Catenina, como nexo de unión entre la membrana y el citoesqueleto (Takai et al., 2008). Sin embargo, el genoma de *Drosophila* no codifica

para ningún ortólogo de Nectina. Como alternativa, otro miembro de la súper-familia de las inmunoglobulinas, Echinoid (Ed), se localiza en las uniones adherentes y puede interactuar con el ortólogo de Afadin en *Drosophila*, **Canoe** (Cno). No obstante, la expresión ectópica de la quimera α -Catenina fusionada a Echinoid sin el dominio VH1, para analizar el requerimiento de α -Catenina unida a E-Cadherina reveló que la unión a Echinoid no mantiene la función de las uniones adherentes en el epitelio folicular ni en el embrión de *Drosophila* (Desai et al., 2013). Sin embargo, α -Catenina interactúa con Canoe regulando la unión con el citoesqueleto de Actina durante la gastrulación de *Drosophila* (Sawyer et al., 2009). Por otro lado, **Polychaetoid** (Pyd), el único ortólogo de la familia de proteínas ZO (*Zonula Occludens*) en *Drosophila* se localiza en las uniones adherentes, donde también interactúa con α -Catenina (Imamura et al., 1999). De manera interesante, tanto Cno como Pyd se requieren para la localización de Enabled (Ena) en las células epidérmicas del *leading-edge* durante el cierre dorsal (Choi et al., 2011). Con estos antecedentes, analizamos si la localización de Pyd y Cno se veía afectada por la reducción de niveles de α -Catenina, mediante el uso de ARNi, cuya expresión en la epidermis lateral baja los niveles de α -Catenina de manera efectiva (Fig. R7). No observamos cambios en la localización de Pyd y Cno en la epidermis durante el cierre dorsal usando el doble ARNi para α -Catenina (datos no mostrados). Sin embargo, sería interesante analizar si existe una interacción entre estas proteínas y los alelos de α -Catenina. En particular según los dominios delecionados podríamos hipotetizar que α -Cat²⁰⁴⁹ no interactuaría con Pyd al tener truncado el dominio VH3, mientras que α -Cat⁴²¹ tampoco lo haría con Cno al tener también delecionado parte del dominio VH2 (Fig. R1).

5.5. Interacción de α -Catenina con proteínas que regulan la arquitectura del citoesqueleto de actomiosina.

El mecanismo por el cual α -Catenina promueve la contracción del citoesqueleto de actomiosina permanece por resolver, pero probablemente sea tanto de manera directa como indirecta, a través de otras proteínas de unión a Actina. Se ha propuesto que α -Catenina compite con las proteínas del **complejo Arp2/3** previniendo así la formación de redes ramificadas de Actina. Si bien se ha descrito que existe una relación antagónica entre α -Catenina y el complejo Arp2/3 en el embrión de

Drosophila (Sarpal et al., 2012), no hemos podido encontrar evidencias de que esto sea así en las células de la *amnioserosa*. El aumento de los niveles de WASp, un regulador positivo del complejo Arp2/3, en las células de la *amnioserosa*, produce defectos en la contracción apical (Fig. R22). Esta observación nos llevó a plantear la hipótesis de que para que se produzca la contracción efectiva, es necesario promover preferentemente la formación de redes lineales de Actina frente a las redes ramificadas, lo que estaría alterado al sobre-expresar WASp. Si esto fuera así, se esperaría que la expresión ectópica conjunta de WASp y α -Catenina, asumiendo que existe una relación antagónica entre ellos, re-establecería el balance entre redes ramificadas y lineales y permitiría la contracción apical. Sin embargo, esto no es lo que se observa, sugiriendo que una relación antagónica entre WASp y α -Catenina no está teniendo lugar en las células de la *amnioserosa*. Una posible explicación sería que nuestros experimentos de sobre-expresión de α -Catenina no estén promoviendo la formación de los dímeros, y que son los que interaccionan con los filamentos de Actina compitiendo por los sitios de unión con el complejo Arp2/3 (Drees et al., 2005). En este sentido, la sobre-expresión de α -Catenina en embriones silvestres no produce cambios en la forma de las células de la *amnioserosa*, sugiriendo que no está promoviendo la formación de redes lineales. Por otro lado, los experimentos de rescate en embriones mutantes para α -Catenina con una forma fusionada de α -Catenina a E-Cadherina, y que corresponde a la forma monomérica, muestran un rescate parcial de los fenotipos cuticulares (Fig. R21). Por lo tanto, el hecho de no conseguir un rescate total podría deberse a que los niveles de expresión alcanzados con la sobre-expresión de la fusión no son suficientes, pero también podría sugerir la necesidad de una población de α -Catenina silvestre que pueda formar dímeros que regulen la arquitectura de las redes de Actina.

Por otro lado, α -Catenina participa en el ensamblado de cables lineales de Actina a nivel de las uniones adherentes. En cultivos de queratinocitos, la Formina-1 interacciona con α -Catenina, permitiendo la elongación de los filamentos de Actina a nivel de las uniones adherentes (Kobielak et al., 2004). La activación de la formación de redes lineales de Actina en las células de la *amnioserosa* a través de la expresión ectópica de una versión constitutivamente activa de **Diaphanous**, perteneciente a la

familia de las forminas en *Drosophila*, induce una contracción apical prematura (Homem and Peifer, 2008). En dicha situación, las células de la *amnioserosa* apenas fluctúan mostrando un tamaño reducido y una forma más isométrica que en una situación normal (Blanchard et al., 2010). En estas células, se desarrollan focos dinámicos de Actina acompañado de un incremento de Actina a nivel de la membranas que estabiliza la E-Cadherina en la membrana (Fischer et al., 2014). La estabilidad de las uniones adherentes está comprometida en embriones mutantes $\alpha\text{-Cat}^{2049}$, por lo tanto, con el objetivo de analizar una posible interacción entre Diaphanous y α -Catenina, sobre-expresamos la versión constitutivamente activa de Diaphanous de manera generalizada y en la *amnioserosa* en embriones mutantes para $\alpha\text{-Cat}^{2049}$ y analizamos el fenotipo cuticular. Como resultado, obtuvimos un aumento de agujeros anteriores y dorsales que parecen deberse al simple hecho de activar la Formina en el embrión, por lo que dicha interacción a través de la estabilización de las uniones quedaría por resolver (datos no mostrados).

Asimismo, se ha descrito que α -Catenina también interacciona con la proteína entrecruzadora de filamentos de Actina, α -Actinina (Nieset et al., 1997). El gen de α -Actinina codifica para 3 isoformas en *Drosophila*, de las cuales 2 son específicas de músculo (Fyrberg et al., 1990). Un trabajo previo intentó aislar una versión mutante para la versión no muscular, sin embargo algo de expresión de la proteína permanecía en el tejido muscular (Wahlstrom et al., 2004). Con el objetivo de analizar la función de α -Actinina no-muscular de manera específica en el cierre dorsal utilizamos las técnicas de ARNi y *deGradFP* sin obtener resultados que evidenciaran un requerimiento de la proteína en el proceso (Fig. R23). Sin embargo, sí hemos observado defectos en la contracción apical de las células de la región ventral del embrión durante la gastrulación cuando se inyectó dsRNA específico para α -Actinina (Fig. R24E). El tipo de defectos que se observó en estas células sugiere alteraciones a nivel de las uniones adherentes al separarse la red de Miosina de la membrana apical de las células (Martin et al., 2010). Por lo tanto, creemos que sería interesante analizar la interacción entre α -Actinina y α -Catenina en el cierre dorsal, mediante experimentos de interacción genética. O en las células ventrales del futuro mesoderma, mediante experimentos de micro-inyección de dsRNA.

5.6. Interacción de α -Catenina con otros componentes del citoesqueleto.

Al igual que los filamentos de Actina, los microtúbulos (MTs) generan fuerzas que producen cambios en la forma celular durante el desarrollo a través de su polimerización y despolimerización. Además, la interacción con los motores moleculares que se mueven a lo largo de los MTs permiten el transporte de diferentes componentes en el interior celular (Fletcher and Mullins, 2010). Se ha descrito el papel de α -Catenina en la regulación de la **dinámica** de los MTs de manera independiente al centrosoma. En concreto, se produce la estabilización de los MTs cuando se sobreexpresa α -Catenina fusionada a E-Cadherina en cultivos de fibroblastos con niveles bajos de E-Cadherina endógena (Shtutman et al., 2008). Además, un ensayo de doble-híbrido detectó la interacción de α -Catenina con la proteína Dinamitina, que forma parte del complejo proteico responsable del **transporte intracelular** a través de MTs. En cultivos de queratinocitos mutantes para α -Catenina se incrementa el transporte de lisosomas, mientras que la expresión ectópica de α -Catenina revierte el proceso. De manera interesante, el mismo ensayo se realizó en un medio con bajos niveles de Calcio, alterando la función de E-Cadherina, y como resultado no se afectó la distancia alcanzada por los lisosomas, sugiriendo que el papel de α -Catenina como regulador del tráfico intracelular es independiente de adhesión (Lien et al., 2008).

Alternativamente, la función de los MTs durante la morfogénesis está empezando a ser objeto de estudio. Durante embriogénesis de *Drosophila*, los tubos de las glándulas salivares se forman por un proceso altamente coordinado de contracción apical del epitelio, dirigido por la **actividad pulsátil** de la red de actomiosina. En dicho proceso, los MTs tienen un papel crucial en estabilizar y mantener la red apical de actomiosina a través de la proteína Short Stop (Shot) permitiendo la formación del tubo (Booth et al., 2014). Durante el cierre dorsal, los MTs se reorganizan durante la elongación de las células de la *amnioserosa* (Pope and Harris, 2008), y en las células epidérmicas del *leading-edge* durante el proceso del cierre en cremallera (Jankovics and Brunner, 2006). Sería interesante analizar la interacción de α -Catenina con los MTs en dichos procesos y durante la contracción apical de las células de la *amnioserosa*, donde hemos observado un incremento en el ciclo de oscilación durante la fase de expansión alterando la función de α -Catenina.

5.7. Relación de α -Catenina con el control del tamaño del tejido.

Otra de las funciones descritas para α -Catenina sería participando en los procesos de regulación del tamaño del tejido, interaccionando de manera directa o indirecta con diferentes vías de señalización. En concreto, la bajada condicional de α -Catenina produce una hiper-proliferación en la epidermis de ratón de manera similar al carcinoma humano, debido al aumento de la vía de señalización de **Ras/MAPK** de manera específica, sin cambios en adhesión o en la vía de señalización de Wnt (Vasioukhin et al., 2001). También se producen defectos en proliferación en el tejido nervioso, debido a la sobre-expresión de diferentes dianas de la vía de **Hedgehog** (Hh) inducido por la bajada de α -Catenina de manera específica en el córtex cerebral del cerebro de ratón (Lien et al., 2006). En todos estos trabajos, α -Catenina actuaría en el mecanismo de inhibición lateral que controla la densidad de células en el tejido.

Recientemente, un trabajo realizado en el disco imaginal de ala de *Drosophila* ha propuesto que el aumento de la tensión generada por el citoesqueleto de actomiosina en la región apical de la célula promovería el crecimiento del tejido a través de la vía de **Hippo**. En particular, el mecanismo que controla el crecimiento reside en la función mecano-transductora de α -Catenina dependiente de tensión. Cuando se aumenta la tensión a través de la actividad del citoesqueleto de actomiosina, se produce la unión de **Ajuba/Jub** a α -Catenina en la membrana apical. Esta interacción permite a su vez que Jub retenga a la proteína quinasa Warts en la membrana que inhibe la función de Yorkie (Yki), favoreciendo la localización de Yki en el núcleo donde activa diferentes genes de proliferación del tejido (Rauskolb et al., 2014). En este sentido, sería interesante continuar con los estudios realizados en el disco imaginal de ala de *Drosophila* permitiendo explorar la interacción de α -Catenina con las diferentes vías de señalización descritas, y de manera particular, identificando el dominio de unión de α -Catenina con la proteína Jub a través del análisis de la interacción con los diferentes alelos mutantes de α -Catenina descritos en esta tesis doctoral.

CONCLUSIONES

1. La serie alélica mutante para los dominios VH2 o VH3 de α -Catenina resulta en alelos de falta de función, los cuales desarrollan agujeros en la región anterior del embrión de *Drosophila* de manera similar al mutante nulo de α -Catenina.
2. El análisis *in vivo* de los embriones mutantes muestra que los procesos morfogénéticos del cierre dorsal y la invaginación de la cabeza están afectados. En particular, hay un enlentecimiento de la velocidad del cierre dorsal con independencia de los agujeros anteriores y de un aumento en la tasa de delaminación de las células de la *amnioserosa*. Además, tanto la morfología del cable supracelular de actomiosina como el proceso del cierre en cremallera presentan defectos.
3. El ciclo de oscilación de las células de la *amnioserosa* está incrementado en los embriones mutantes para α -Catenina debido a un aumento preferencial en su fase de expansión. Asimismo, la apariencia corrugada de las membranas sugiere defectos en la tensión de las células que no han podido ser confirmados experimentalmente.
4. La dinámica del citoesqueleto de Actina en la región medio-apical de las células de la *amnioserosa* está regulada por α -Catenina, que promueve la estabilización y formación de los focos de Actina.
5. α -Catenina regula la estabilización de E-Cadherina en las membranas. Esto sugiere que la actividad del citoesqueleto de actomiosina en la región medio-apical estaría regulando la estabilidad de las uniones a través de la interacción con α -Catenina.
6. La falta de Vinculina agrava el fenotipo cuticular de falta de función de α -Catenina, sugiriendo que en los mutantes para α -Catenina, Vinculina puede compensar parcialmente su función.

7. Vinculina es reclutada en la membrana apical de las células de la *amnioserosa* dependiente de tensión, probablemente a través de su interacción con α -Catenina revelando la existencia de un módulo mecano-sensible actuando en la *amnioserosa*.
8. La expresión ectópica en todo el embrión de una forma de α -Catenina silvestre como de una forma de α -Catenina unida a E-Cadherina rescatan parcialmente los defectos cuticulares producidos por la falta de función de α -Catenina, sugiriendo que la forma de α -Catenina monomérica es funcional. Sin embargo, la expresión ectópica de cualquiera de estas formas solo en la *amnioserosa* no produce un rescate, mostrando que es necesario un balance de adhesión entre la epidermis y la *amnioserosa*.
9. La relación antagónica entre α -Catenina y el complejo Arp2/3 no está teniendo lugar en las células de la *amnioserosa* lo que sugeriría la existencia de mecanismos alternativos para la función de α -Catenina durante el cierre dorsal.
10. Las proteínas Filamina y α -Actinina se localizan ambas en el *leading-edge* durante el cierre dorsal. En las células de la *amnioserosa* y en las células ventrales del futuro mesodermo de *Drosophila*, la Filamina co-localiza con el citoesqueleto de actomiosina en la región medio-apical. Tanto la falta de función Filamina como de α -Actinina afecta al comportamiento contráctil de algunas células de la región ventral durante la gastrulación.

CONCLUSIONS

1. Mutant allelic series of VH2 and VH3 α -Catenin domains result in loss-of-function alleles, which develop holes in the anterior region of the *Drosophila* embryo similarly to null mutants.
2. Mutant embryos show head involution defects and dorsal closure delay. This delay is independent of the anterior hole formation and the delamination rate of *amnioserosa* cells. Besides, the actomyosin supracellular cable and zipper process are affected.
3. Oscillation cycle of *amnioserosa* cells is increased in α -Catenin mutant embryos due to a preferential increase in the half-cycle expansion. Moreover, the corrugated appearance of the membranes in α -Catenin mutants suggests tension defects although we could not further confirm this observation.
4. α -Catenin regulates actin cytoskeleton dynamics in the medio-apical region of *amnioserosa* cells, promoting actin foci formation and stabilization.
5. α -Catenin regulates E-Cadherin stabilization at the membranes, indicating that actomyosin networks activity in the medio-apical region modulates adherens junctions stability through α -Catenin interaction.
6. Vinculin loss induces α -Catenin loss-of-function enhancement in cuticle phenotype. Thus, Vinculin could partially compensate α -Catenin function in mutant embryos.

7. Vinculin is recruited at the apical membranes of *amnioserosa* cells in a tension-dependent manner, probably through α -Catenin interaction, suggesting the existence of a mechano-sensing module in the *amnioserosa*.
8. Whole embryo ectopic expression of wild type α -Catenin and α -Catenin-E-Cadherin chimera results in partial rescue of cuticle defects demonstrating functionality of monomeric α -Catenin. However, the ectopic expression in *amnioserosa* does not rescue cuticle defects, highlighting the need for an epidermis and *amnioserosa* adhesion balance.
9. No antagonistic interaction between α -Catenin and Arp2/3 complex is found in *amnioserosa* cells suggesting an alternative mechanism for α -Catenin function during dorsal closure.
10. Filamin and α -Actinin proteins are both localised at the leading-edge during dorsal closure. Although in *amnioserosa* and ventral furrow cells, only Filamin co-localises with actomyosin cytoskeleton in the medio-apical region. Both Filamin and α -Actinin down-regulation affect contraction in some ventral furrow cells during gastrulation.

BIBLIOGRAFIA

- AZEVEDO, D., ANTUNES, M., PRAG, S., MA, X., HACKER, U., BRODLAND, G. W., HUTSON, M. S., SOLON, J. & JACINTO, A. 2011. DRhoGEF2 regulates cellular tension and cell pulsations in the Amnioserosa during *Drosophila* dorsal closure. *PLoS One*, 6, e23964.
- BELACORTU, Y. & PARICIO, N. 2011. *Drosophila* as a model of wound healing and tissue regeneration in vertebrates. *Dev Dyn*, 240, 2379-404.
- BENJAMIN, J. M., KWIATKOWSKI, A. V., YANG, C., KOROBOVA, F., POKUTTA, S., SVITKINA, T., WEIS, W. I. & NELSON, W. J. 2010. AlphaE-catenin regulates actin dynamics independently of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol*, 189, 339-52.
- BIANCHINI, J. M., KITT, K. N., GLOERICH, M., POKUTTA, S., WEIS, W. I. & NELSON, W. J. 2015. Reevaluating alphaE-catenin monomer and homodimer functions by characterizing E-cadherin/alphaE-catenin chimeras. *J Cell Biol*, 210, 1065-74.
- BISCHOFF, M., GRADILLA, A. C., SEIJO, I., ANDRES, G., RODRIGUEZ-NAVAS, C., GONZALEZ-MENDEZ, L. & GUERRERO, I. 2013. Cytonemes are required for the establishment of a normal Hedgehog morphogen gradient in *Drosophila* epithelia. *Nat Cell Biol*, 15, 1269-81.
- BLANCHARD, G. B., KABLA, A. J., SCHULTZ, N. L., BUTLER, L. C., SANSON, B., GORFINKIEL, N., MAHADEVAN, L. & ADAMS, R. J. 2009. Tissue tectonics: morphogenetic strain rates, cell shape change and intercalation. *Nat Methods*, 6, 458-64.
- BLANCHARD, G. B., MURUGESU, S., ADAMS, R. J., MARTINEZ-ARIAS, A. & GORFINKIEL, N. 2010. Cytoskeletal dynamics and supracellular organisation of cell shape fluctuations during dorsal closure. *Development*, 137, 2743-52.
- BLANCHON, L., BOUJEMAA-PATERSKI, R., SYKES, C. & PLASTINO, J. 2014. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev*, 94, 235-63.
- BOGDAN, S., STEPHAN, R., LOBKE, C., MERTENS, A. & KLAMBT, C. 2005. Abi activates WASP to promote sensory organ development. *Nat Cell Biol*, 7, 977-84.
- BOOTH, A. J., BLANCHARD, G. B., ADAMS, R. J. & ROPER, K. 2014. A dynamic microtubule cytoskeleton directs medial actomyosin function during tube formation. *Dev Cell*, 29, 562-76.
- BRAND, A. H. & PERRIMON, N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118, 401-415.
- BUCKLEY, C. D., TAN, J., ANDERSON, K. L., HANEIN, D., VOLKMANN, N., WEIS, W. I., NELSON, W. J. & DUNN, A. R. 2014. Cell adhesion. The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science*, 346, 1254211.
- BULGAKOVA, N. A. & BROWN, N. H. 2016. *Drosophila* p120-catenin is crucial for endocytosis of the dynamic E-cadherin-Bazooka complex. *J Cell Sci*, 129, 477-82.
- BUTLER, L. C., BLANCHARD, G. B., KABLA, A. J., LAWRENCE, N. J., WELCHMAN, D. P., MAHADEVAN, L., ADAMS, R. J. & SANSON, B. 2009. Cell shape changes indicate a role for extrinsic tensile forces in *Drosophila* germ-band extension. *Nat Cell Biol*, 11, 859-64.
- CAI, D., CHEN, S. C., PRASAD, M., HE, L., WANG, X., CHOESMEL-CADAMURO, V., SAWYER, J. K., DANUSER, G. & MONTELL, D. J. 2014. Mechanical feedback

- through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration. *Cell*, 157, 1146-59.
- CAUSSINUS, E., KANCA, O. & AFFOLTER, M. 2012. Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nat Struct Mol Biol*, 19, 117-21.
- CAUSSINUS, E., KANCA, O. & AFFOLTER, M. 2013. Protein knockouts in living eukaryotes using deGradFP and green fluorescent protein fusion targets. *Curr Protoc Protein Sci*, 73, Unit 30 2.
- CAVEY, M., RAUZI, M., LENNE, P. F. & LECUIT, T. 2008. A two-tiered mechanism for stabilization and immobilization of E-cadherin. *Nature*, 453, 751-6.
- CHEN, H., COHEN, D. M., CHOUDHURY, D. M., KIOKA, N. & CRAIG, S. W. 2005. Spatial distribution and functional significance of activated vinculin in living cells. *J Cell Biol*, 169, 459-70.
- CHOI, W., JUNG, K. C., NELSON, K. S., BHAT, M. A., BEITEL, G. J., PEIFER, M. & FANNING, A. S. 2011. The single *Drosophila* ZO-1 protein Polychaetoid regulates embryonic morphogenesis in coordination with Canoe/afadin and Enabled. *Mol Biol Cell*, 22, 2010-30.
- COOPER, J. A. 1987. Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. *The Journal of Cell Biology*, 105, 1473-1478.
- COSTA, M., RAICH, W., AGBUNAG, C., LEUNG, B., HARDIN, J. & PRIESS, J. R. 1998. Morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* Embryo. *The Journal of Cell Biology*, 141, 297-308.
- DAVID, D. J., TISHKINA, A. & HARRIS, T. J. 2010. The PAR complex regulates pulsed actomyosin contractions during amnioserosa apical constriction in *Drosophila*. *Development*, 137, 1645-55.
- DELVA, E. & KOWALCZYK, A. P. 2009. Regulation of cadherin trafficking. *Traffic*, 10, 259-67.
- DEMALI, K. A., BARLOW, C. A. & BURRIDGE, K. 2002. Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol*, 159, 881-91.
- DESAI, R., SARPAL, R., ISHIYAMA, N., PELLIKKA, M., IKURA, M. & TEPASS, U. 2013. Monomeric alpha-catenin links cadherin to the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol*, 15, 261-73.
- DIERKES, K., SUMI, A., SOLON, J. & SALBREUX, G. 2014. Spontaneous oscillations of elastic contractile materials with turnover. *Phys Rev Lett*, 113, 148102.
- DJINOVIC-CARUGO, K., YOUNG, P., GAUTEL, M. & SARASTE, M. 1999. Structure of the alpha-Actinin Rod: Molecular Basis for Cross-Linking of Actin Filaments. *Cell*, 98, 537-546.
- DREES, F., POKUTTA, S., YAMADA, S., NELSON, W. J. & WEIS, W. I. 2005. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell*, 123, 903-15.
- DUCUING, A., KEELEY, C., MOLLEREAU, B. & VINCENT, S. 2015. A DPP-mediated feed-forward loop canalizes morphogenesis during *Drosophila* dorsal closure. *J Cell Biol*, 208, 239-48.
- EBRAHIM, S., FUJITA, T., MILLIS, B. A., KOZIN, E., MA, X., KAWAMOTO, S., BAIRD, M. A., DAVIDSON, M., YONEMURA, S., HISA, Y., CONTI, M. A., ADELSTEIN, R. S., SAKAGUCHI, H. & KACHAR, B. 2013. NMII forms a contractile transcellular

- sarcomeric network to regulate apical cell junctions and tissue geometry. *Curr Biol*, 23, 731-6.
- EDWARDS, K. A., DEMSKY, M., MONTAGUE, R., WEYMOUTH, N. & KIEHART, D. P. 1997. GFP-Moesin Illuminates Actin Cytoskeleton Dynamics in Living Tissue and Demonstrates Cell Shape Changes during Morphogenesis in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 191, 103-117.
- EHRLICHER, A. J., NAKAMURA, F., HARTWIG, J. H., WEITZ, D. A. & STOSSEL, T. P. 2011. Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A. *Nature*, 478, 260-3.
- ELLIS, S. J., GOULT, B. T., FAIRCHILD, M. J., HARRIS, N. J., LONG, J., LOBO, P., CZERNIECKI, S., VAN PETEGEM, F., SCHOCK, F., PEIFER, M. & TANENTZAPF, G. 2013. Talin autoinhibition is required for morphogenesis. *Curr Biol*, 23, 1825-33.
- ESCOBAR, D. J., DESAI, R., ISHIYAMA, N., FOLMSBEE, S. S., NOVAK, M. N., FLOZAK, A. S., DAUGHERTY, R. L., MO, R., NANAVATI, D., SARPAL, R., LECKBAND, D., IKURA, M., TEPASS, U. & GOTTARDI, C. J. 2015. alpha-Catenin phosphorylation promotes intercellular adhesion through a dual-kinase mechanism. *J Cell Sci*, 128, 1150-65.
- ESCUDERO, L. M., COSTA LDA, F., KICHEVA, A., BRISCOE, J., FREEMAN, M. & BABU, M. M. 2011. Epithelial organisation revealed by a network of cellular contacts. *Nat Commun*, 2, 526.
- EVANS, C. J., OLSON, J. M., NGO, K. T., KIM, E., LEE, N. E., KUOY, E., PATANANAN, A. N., SITZ, D., TRAN, P., DO, M. T., YACKLE, K., CESPEDES, A., HARTENSTEIN, V., CALL, G. B. & BANERJEE, U. 2009. G-TRACE: rapid Gal4-based cell lineage analysis in *Drosophila*. *Nat Methods*, 6, 603-5.
- FERNANDEZ, B. G., ARIAS, A. M. & JACINTO, A. 2007. Dpp signalling orchestrates dorsal closure by regulating cell shape changes both in the amnioserosa and in the epidermis. *Mech Dev*, 124, 884-97.
- FERNANDEZ-GONZALEZ, R. & ZALLEN, J. A. 2011. Oscillatory behaviors and hierarchical assembly of contractile structures in intercalating cells. *Phys Biol*, 8, 045005.
- FIGARD, L., XU, H., GARCIA, H. G., GOLDING, I. & SOKAC, A. M. 2013. The plasma membrane flattens out to fuel cell-surface growth during *Drosophila* cellularization. *Dev Cell*, 27, 648-55.
- FISCHER, S. C., BLANCHARD, G. B., DUQUE, J., ADAMS, R. J., ARIAS, A. M., GUEST, S. D. & GORFINKIEL, N. 2014. Contractile and mechanical properties of epithelia with perturbed actomyosin dynamics. *PLoS One*, 9, e95695.
- FLETCHER, D. A. & MULLINS, R. D. 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463, 485-92.
- FYRBERG, E., KELLY, M., BALL, E., FYRBERG, C. & REEDY, M. C. 1990. Molecular Genetics of *Drosophila* Alpha-Actinin: Mutant Alleles Disrupt Z Disc Integrity and Muscle Insertions. *The Journal of Cell Biology*, 110, 1999-2011.
- GATES, J., MAHAFFEY, J. P., ROGERS, S. L., EMERSON, M., ROGERS, E. M., SOTTILE, S. L., VAN VACTOR, D., GERTLER, F. B. & PEIFER, M. 2007. Enabled plays key roles in embryonic epithelial morphogenesis in *Drosophila*. *Development*, 134, 2027-39.
- GOLEY, E. D. & WELCH, M. D. 2006. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 713-26.
- GORFINKIEL, N. 2016. From Actomyosin Oscillations To Tissue-Level Deformations. *Developmental Dynamics*, 245, 268-275.

- GORFINKIEL, N. & BLANCHARD, G. B. 2011. Dynamics of actomyosin contractile activity during epithelial morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 23, 531-9.
- GORFINKIEL, N., BLANCHARD, G. B., ADAMS, R. J. & MARTINEZ ARIAS, A. 2009. Mechanical control of global cell behaviour during dorsal closure in *Drosophila*. *Development*, 136, 1889-98.
- GORFINKIEL, N. & MARTÍNEZ-ARIAS, A. 2007. Requirements for adherens junction components in the interaction between epithelial tissues during dorsal closure in *Drosophila*. *J Cell Sci*, 120, 3289-98.
- GRASHOFF, C., HOFFMAN, B. D., BRENNER, M. D., ZHOU, R., PARSONS, M., YANG, M. T., MCLEAN, M. A., SLIGAR, S. G., CHEN, C. S., HA, T. & SCHWARTZ, M. A. 2010. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature*, 466, 263-6.
- GRILL, S. W. 2011. Growing up is stressful: biophysical laws of morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev*, 21, 647-52.
- HARRIS, T. J. C., SAWYER, J. K. & PEIFER, M. 2009. Chapter 3 How the Cytoskeleton Helps Build the Embryonic Body Plan. 89, 55-85.
- HASKEL-ITTAH, M., BEN-ZVI, D., BRANSKI-ARIELI, M., SCHEJTER, E. D., SHILO, B. Z. & BARKAI, N. 2012. Self-organized shuttling: generating sharp dorsoventral polarity in the early *Drosophila* embryo. *Cell*, 150, 1016-28.
- HAZAN, R. B., KANG, L., ROE, S., BORGES, P. I. & RIMM, D. L. 1997. Vinculin Is Associated with the E-cadherin Adhesion Complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 32448–32453.
- HE, B., DOUBROVINSKI, K., POLYAKOV, O. & WIESCHAUS, E. 2014. Apical constriction drives tissue-scale hydrodynamic flow to mediate cell elongation. *Nature*, 508, 392-6.
- HE, L., WANG, X., TANG, H. L. & MONTELL, D. J. 2010. Tissue elongation requires oscillating contractions of a basal actomyosin network. *Nat Cell Biol*, 12, 1133-42.
- HIGGS, H. N. & POLLARD, T. D. 2001. REGULATION OF ACTIN FILAMENT NETWORK FORMATION THROUGH ARP2/3 COMPLEX: Activation by a Diverse Array of Proteins. *Annu Rev Biochem*, 70, 649–676.
- HOMEM, C. C. & PEIFER, M. 2008. Diaphanous regulates myosin and adherens junctions to control cell contractility and protrusive behavior during morphogenesis. *Development*, 135, 1005-18.
- HU, N. & CASTELLI-GAIR, J. 1998. Study of the Posterior Spiracles of *Drosophila* as a Model to Understand the Genetic and Cellular Mechanisms Controlling Morphogenesis. *Developmental Biology*, 214, 197–210.
- HUANG, J., ZHOU, W., DONG, W. & HONG, Y. 2009a. Targeted engineering of the *Drosophila* genome. *Fly*, 3, 274-7.
- HUANG, J., ZHOU, W., DONG, W., WATSON, A. M. & HONG, Y. 2009b. From the Cover: Directed, efficient, and versatile modifications of the *Drosophila* genome by genomic engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 8284-9.
- HUANG, J. D., SCHWYTER, D. H., SHIROKAWA, J. M. & COUREY, A. J. 1993. The interplay between multiple enhancer and silencer elements defines the pattern of decapentaplegic expression. *Genes & Development*, 7, 694-704.

- HUTSON, M. S., TOKUTAKE, Y., CHANG, M. S., BLOOR, J. W., VENAKIDES, S., KIEHART, D. P. & EDWARDS, G. S. 2003. Forces for morphogenesis investigated with laser microsurgery and quantitative modeling. *Science*, 300, 145-9.
- HUVENEERS, S. & DE ROOIJ, J. 2013. Mechanosensitive systems at the cadherin-F-actin interface. *J Cell Sci*, 126, 403-13.
- IMAMURA, Y., ITOH, M., MAENO, Y., TSUKITA, S. & NAGAFUCHI, A. 1999. Functional Domains of Alpha-Catenin Required for the Strong State of Cadherin-based Cell Adhesion. *The Journal of Cell Biology*, 144, 1311-1322.
- INGBER, D. E. 2006. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J*, 20, 811-27.
- JACINTO, A., WOOD, W., BALAYO, T., TURMAINE, M., MARTINEZ-ARIAS, A. & MARTIN, P. 2000. Dynamic actin-based epithelial adhesion and cell matching during *Drosophila* dorsal closure. *Curr Biol*, 10, 1420-1426.
- JACINTO, A., WOOD, W., WOOLNER, S., HILEY, C., TURNER, L., WILSON, C., MARTINEZ-ARIAS, A. & MARTIN, P. 2002. Dynamic Analysis of Actin Cable Function during *Drosophila* Dorsal Closure. *Curr Biol*, 12, 1245-1250.
- JANKOVICS, F. & BRUNNER, D. 2006. Transiently reorganized microtubules are essential for zippering during dorsal closure in *Drosophila melanogaster*. *Dev Cell*, 11, 375-85.
- JAYASINGHE, A. K., ROHNER, J. & HUTSON, M. S. 2011. Holographic UV laser microsurgery. *Biomedical Optics Express*, 2, 2590-2598.
- JULICHER, F. & PROST, J. 1995. Cooperative molecular motors. *Phys Rev Lett*, 75, 2618-2621.
- KALTSCHMIDT, J. A., LAWRENCE, N., MOREL, V., BALAYO, T., FERNANDEZ, B. G., PELISSIER, A., JACINTO, A. & MARTINEZ ARIAS, A. 2002. Planar polarity and actin dynamics in the epidermis of *Drosophila*. *Nat Cell Biol*, 4, 937-44.
- KIEHART, D. P., GALBRAITH, C. G., EDWARDS, G. S., RICKOLL, W. L. & MONTAGUE, R. 2000. Multiple Forces Contribute to Cell Sheet Morphogenesis for Dorsal Closure in *Drosophila*. *The Journal of Cell Biology*, 149, 471-490.
- KIM, T. J., ZHENG, S., SUN, J., MUHAMED, I., WU, J., LEI, L., KONG, X., LECKBAND, D. E. & WANG, Y. 2015. Dynamic visualization of alpha-catenin reveals rapid, reversible conformation switching between tension states. *Curr Biol*, 25, 218-24.
- KIM, Y. S., FRITZ, J. L., SENEVIRATNE, A. K. & VANBERKUM, M. F. 2002. Constitutively active myosin light chain kinase alters axon guidance decisions in *Drosophila* embryos. *Dev Biol*, 249, 367-81.
- KLAPHOLZ, B., HERBERT, S. L., WELLMANN, J., JOHNSON, R., PARSONS, M. & BROWN, N. H. 2015. Alternative mechanisms for talin to mediate integrin function. *Curr Biol*, 25, 847-57.
- KOBIELAK, A. & FUCHS, E. 2004. Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 614-25.
- KOBIELAK, A., PASOLLI, H. A. & FUCHS, E. 2004. Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat Cell Biol*, 6, 21-30.
- KOENDERINKA, G. H., DOGIC, Z., NAKAMURA, F., BENDIX, P. M., MACKINTOSH, F. C., HARTWIG, J. H., STOSSEL, T. P. & WEITZ, D. A. 2009. An active biopolymer

- network controlled by molecular motors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 15192–15197
- KORIDE, S., HE, L., XIONG, L., LAN, G., MONTELL, D. J. & SUNE, S. X. 2014. Mechanochemical regulation of oscillatory follicle cell dynamics in the developing *Drosophila* egg chamber. *Mol Biol of the Cell*, 1-15.
- KOSLOV, E. R., MAUPIN, P., PRADHAN, D., MORROW, J. S. & RIMM, D. L. 1997. Alpha-Catenin Can Form Asymmetric Homodimeric Complexes and/or Heterodimeric Complexes with Beta-Catenin. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 27301–27306.
- KRUSE, K. & JULICHER, F. 2005. Oscillations in cell biology. *Curr Opin Cell Biol*, 17, 20-6.
- KRUSE, K. & RIVELINE, D. 2011. Spontaneous mechanical oscillations: implications for developing organisms. *Curr Top Dev Biol*, 95, 67-91.
- KURISU, S. & TAKENAWA, T. 2009. The WASP and WAVE family proteins. *Genome Biol*, 10, 226.
- KWIATKOWSKI, A. V., MAIDEN, S. L., POKUTTA, S., CHOI, H. J., BENJAMIN, J. M., LYNCH, A. M., NELSON, W. J., WEIS, W. I. & HARDIN, J. 2010. In vitro and in vivo reconstitution of the cadherin-catenin-actin complex from *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 14591-6.
- LANGEVIN, J., MORGAN, M. J., ROSSÉ, C., RACINE, V., SIBARITA, J.-B., ARESTA, S., MURTHY, M., SCHWARZ, T., CAMONIS, J. & BELLAÏCHE, Y. 2005. *Drosophila* Exocyst Components Sec5, Sec6, and Sec15 Regulate DE-Cadherin Trafficking from Recycling Endosomes to the Plasma Membrane. *Developmental Cell*, 9, 365-376.
- LARUE, L., ANTOS, C., BUTZ, S., HUBER, O., DELMAS, V., DOMINIS, M. & KEMLER, R. 1996. A role for cadherins in tissue formation. *Development*, 122, 3185-3194.
- LAWRENCE, P. A., BODMER, R. & VINCENT, J. P. 1995. Segmental patterning of heart precursors in *Drosophila*. *Development*, 121, 4303-4308.
- LE DUC, Q., SHI, Q., BLONK, I., SONNENBERG, A., WANG, N., LECKBAND, D. & DE ROOIJ, J. 2010. Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner. *J Cell Biol*, 189, 1107-15.
- LECUIT, T. & LENNE, P. F. 2007. Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 633-44.
- LECUIT, T. & YAP, A. S. 2015. E-cadherin junctions as active mechanical integrators in tissue dynamics. *Nat Cell Biol*, 17, 533-9.
- LEE, A. & TREISMAN, J. E. 2004. Excessive Myosin Activity in Mbs Mutants Causes Photoreceptor Movement Out of the *Drosophila* Eye Disc Epithelium. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 3285–3295.
- LEERBERG, J. M., GOMEZ, G. A., VERMA, S., MOUSSA, E. J., WU, S. K., PRIYA, R., HOFFMAN, B. D., GRASHOFF, C., SCHWARTZ, M. A. & YAP, A. S. 2014. Tension-sensitive actin assembly supports contractility at the epithelial zonula adherens. *Curr Biol*, 24, 1689-99.
- LEIBFRIED, A., FRICKE, R., MORGAN, M. J., BOGDAN, S. & BELLAÏCHE, Y. 2008. *Drosophila* Cip4 and WASp define a branch of the Cdc42-Par6-aPKC pathway regulating E-cadherin endocytosis. *Curr Biol*, 18, 1639-48.
- LEVAYER, R. & LECUIT, T. 2013. Oscillation and polarity of E-cadherin asymmetries control actomyosin flow patterns during morphogenesis. *Dev Cell*, 26, 162-75.

- LI, M., SERR, M., EDWARDS, K., LUDMANN, S., YAMAMOTO, D., TILNEY, L. G., FIELD, C. M. & HAYS, T. S. 1999. Filamin Is Required for Ring Canal Assembly and Actin Organization during *Drosophila* Oogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 146, 1061–1073.
- LIEN, W. H., GELFAND, V. I. & VASIOUKHIN, V. 2008. Alpha-E-catenin binds to dynamin and regulates dynactin-mediated intracellular traffic. *J Cell Biol*, 183, 989-97.
- LIEN, W. H., KLEZOVITCH, O., FERNANDEZ, T. E., DELROW, J. & VASIOUKHIN, V. 2006. aE-Catenin Controls Cerebral Cortical Size by Regulating the Hedgehog Signaling Pathway.
- LOWE, N., REES, J. S., ROOTE, J., RYDER, E., ARMEAN, I. M., JOHNSON, G., DRUMMOND, E., SPRIGGS, H., DRUMMOND, J., MAGBANUA, J. P., NAYLOR, H., SANSON, B., BASTOCK, R., HUELSMANN, S., TROVISCO, V., LANDGRAF, M., KNOWLES-BARLEY, S., ARMSTRONG, J. D., WHITE-COOPER, H., HANSEN, C., PHILLIPS, R. G., CONSORTIUM, U. K. D. P. T. S., LILLEY, K. S., RUSSELL, S. & ST JOHNSTON, D. 2014. Analysis of the expression patterns, subcellular localisations and interaction partners of *Drosophila* proteins using a pigP protein trap library. *Development*, 141, 3994-4005.
- LUO, T., MOHAN, K., IGLESIAS, P. A. & ROBINSON, D. N. 2013. Molecular mechanisms of cellular mechanosensing. *Nat Mater*, 12, 1064-71.
- LYNCH, H. E., CREWS, S. M., ROSENTHAL, B., KIM, E., GISH, R., ECHIVERRI, K. & HUTSON, M. S. 2013. Cellular mechanics of germ band retraction in *Drosophila*. *Dev Biol*, 384, 205-13.
- MA, X., LYNCH, H. E., SCULLY, P. C. & HUTSON, M. S. 2009. Probing embryonic tissue mechanics with laser hole drilling. *Phys Biol*, 6, 036004.
- MACHADO, P. F., BLANCHARD, G. B., DUQUE, J. & GORFINKIEL, N. 2014. Cytoskeletal turnover and Myosin contractility drive cell autonomous oscillations in a model of *Drosophila* Dorsal Closure. *The European Physical Journal Special Topics*, 223, 1391-1402.
- MAGIE, C. R., PINTO-SANTINI, D. & PARKHURST, S. M. 2002. Rho1 interacts with p120ctn and α -catenin, and regulates cadherin-based adherens junction components in *Drosophila*. *Development* 129, 3771-3782.
- MAIDEN, S. L., HARRISON, N., KEEGAN, J., CAIN, B., LYNCH, A. M., PETTITT, J. & HARDIN, J. 2013. Specific conserved C-terminal amino acids of *Caenorhabditis elegans* HMP-1/ α -catenin modulate F-actin binding independently of vinculin. *J Biol Chem*, 288, 5694-706.
- MAMMOTO, T. & INGBER, D. E. 2010. Mechanical control of tissue and organ development. *Development*, 137, 1407-20.
- MANSEAU, L., BARADARAN, A., BROWER, D., BUDHU, A., ELEFANT, F., PHAN, H., PHILP, A. V., YANG, M., GLOVER, D., KAISER, K., PALTER, K. & SELLECK, S. 1997. GAL4 Enhancer Traps Expressed in the Embryo, Larval Brain, Imaginal Discs, and Ovary of *Drosophila*. *Developmental Dynamics*, 209, 310-322.
- MARTIN, A. C., GELBART, M., FERNANDEZ-GONZALEZ, R., KASCHUBE, M. & WIESCHAUS, E. F. 2010. Integration of contractile forces during tissue invagination. *J Cell Biol*, 188, 735-49.
- MARTIN, A. C., KASCHUBE, M. & WIESCHAUS, E. F. 2009. Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction. *Nature*, 457, 495-9.

- MARTIN-BLANCO, E., GAMPEL, A., RING, J., VIRDEE, K., KIROV, N., TOLKOVSKY, A. M. & MARTINEZ-ARIAS, A. 1998. puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes & Development*, 12, 557–570.
- MASON, F. M., TWOROGGER, M. & MARTIN, A. C. 2013. Apical domain polarization localizes actin-myosin activity to drive ratchet-like apical constriction. *Nat Cell Biol*, 15, 926-36.
- MATEUS, A. M., GORFINKIEL, N., SCHAMBERG, S. & MARTINEZ ARIAS, A. 2011. Endocytic and recycling endosomes modulate cell shape changes and tissue behaviour during morphogenesis in *Drosophila*. *PLoS One*, 6, e18729.
- MAZUMDAR, A. & MAZUMDAR, M. 2002. How one becomes many: blastoderm cellularization in *Drosophila melanogaster*. *Bioessays*, 24, 1012-22.
- MEGHANA, C., RAMDAS, N., HAMEED, F. M., RAO, M., SHIVASHANKARB, G. V. & NARASIMHA, M. 2011. Integrin adhesion drives the emergent polarization of active cytoskeletal stresses to pattern cell delamination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 9107-9112.
- MICHELOT, A. & DRUBIN, D. G. 2011. Building distinct actin filament networks in a common cytoplasm. *Curr Biol*, 21, R560-9.
- MITONAKA, T., MURAMATSU, Y., SUGIYAMA, S., MIZUNO, T. & NISHIDA, Y. 2007. Essential roles of myosin phosphatase in the maintenance of epithelial cell integrity of *Drosophila* imaginal disc cells. *Dev Biol*, 309, 78-86.
- MUKHINA, S., WANG, Y. L. & MURATA-HORI, M. 2007. Alpha-actinin is required for tightly regulated remodeling of the actin cortical network during cytokinesis. *Dev Cell*, 13, 554-65.
- MULIYIL, S., KRISHNAKUMAR, P. & NARASIMHA, M. 2011. Spatial, temporal and molecular hierarchies in the link between death, delamination and dorsal closure. *Development*, 138, 3043-54.
- MULIYIL, S. & NARASIMHA, M. 2014. Mitochondrial ROS regulates cytoskeletal and mitochondrial remodeling to tune cell and tissue dynamics in a model for wound healing. *Dev Cell*, 28, 239-52.
- MUNJAL, A., PHILIPPE, J. M., MUNRO, E. & LECUIT, T. 2015. A self-organized biomechanical network drives shape changes during tissue morphogenesis. *Nature*, 524, 351-5.
- NAKAMURA, F., SONG, M., HARTWIG, J. H. & STOSSEL, T. P. 2014. Documentation and localization of force-mediated filamin A domain perturbations in moving cells. *Nat Commun*, 5, 4656.
- NI, J. Q., ZHOU, R., CZECH, B., LIU, L. P., HOLDERBAUM, L., YANG-ZHOU, D., SHIM, H. S., TAO, R., HANDLER, D., KARPOWICZ, P., BINARI, R., BOOKER, M., BRENNECKE, J., PERKINS, L. A., HANNON, G. J. & PERRIMON, N. 2011. A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*. *Nat Methods*, 8, 405-7.
- NIESET, J. E., REDFIELD, A. R., JIN, F., KNUDSEN, K. A., JOHNSON, K. R. & WHEELOCK, M. J. 1997. Characterization of the interactions of α -catenin with α -actinin and β -catenin/plakoglobin. *Journal of Cell Science*, 110, 1013-1022.
- NOWOTARSKI, S. H., MCKEON, N., MOSER, R. J. & PEIFER, M. 2014. The actin regulators Enabled and Diaphanous direct distinct protrusive behaviors in different tissues during *Drosophila* development. *Mol Biol Cell*, 25, 3147-65.

- ODA, H. & TSUKITA, S. 2001. Real-time imaging of cell-cell adherens junctions reveals that *Drosophila* mesoderm invagination begins with two phases of apical constriction of cells. *J Cell Sci*, 114, 493-501.
- ODA, H., UEMURA, T., SHIOMI, K., NAGAFUCHI, A., TSUKITA, S. & TAKEICHI, M. 1993. Identification of a *Drosophila* Homologue of c -Catenin and Its Association with the armadillo Protein. *The Journal of Cell Biology*, 121, 1133-1140.
- PACQUELET, A. & RORTH, P. 2005. Regulatory mechanisms required for DE-cadherin function in cell migration and other types of adhesion. *J Cell Biol*, 170, 803-12.
- PAK, C. W., FLYNN, K. C. & BAMBURG, J. R. 2008. Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nat Rev Neurosci*, 9, 136-47.
- PANFILIO, K. A. 2008. Extraembryonic development in insects and the acrobatics of blastokinesis. *Dev Biol*, 313, 471-91.
- PANTAZIS, P. & SUPATTO, W. 2014. Advances in whole-embryo imaging: a quantitative transition is underway. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 327-39.
- PERALTA, X. G., TOYAMA, Y., HUTSON, M. S., MONTAGUE, R., VENAKIDES, S., KIEHART, D. P. & EDWARDS, G. S. 2007. Upregulation of forces and morphogenic asymmetries in dorsal closure during *Drosophila* development. *Biophys J*, 92, 2583-96.
- PERRY, M. W., BOETTIGER, A. N., BOTHMA, J. P. & LEVINE, M. 2010. Shadow enhancers foster robustness of *Drosophila* gastrulation. *Curr Biol*, 20, 1562-7.
- PLACAIS, P. Y., BALLAND, M., GUERIN, T., JOANNY, J. F. & MARTIN, P. 2009. Spontaneous oscillations of a minimal actomyosin system under elastic loading. *Phys Rev Lett*, 103, 158102.
- POKUTTA, S., DREES, F., TAKAI, Y., NELSON, W. J. & WEIS, W. I. 2002. Biochemical and structural definition of the I-afadin- and actin-binding sites of alpha-catenin. *J Biol Chem*, 277, 18868-74.
- POKUTTA, S. & WEIS, W. I. 2000. Structure of the Dimerization and Alpha-Catenin-Binding Region of Beta-Catenin. *Molecular Cell*, 5, 533-543.
- POKUTTA, S. & WEIS, W. I. 2007. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 237-61.
- POPE, K. L. & HARRIS, T. J. 2008. Control of cell flattening and junctional remodeling during squamous epithelial morphogenesis in *Drosophila*. *Development*, 135, 2227-38.
- QUINONES-COELLO, A. T., PETRELLA, L. N., AYERS, K., MELILLO, A., MAZZALUPO, S., HUDSON, A. M., WANG, S., CASTIBLANCO, C., BUSZCZAK, M., HOSKINS, R. A. & COOLEY, L. 2007. Exploring strategies for protein trapping in *Drosophila*. *Genetics*, 175, 1089-104.
- RAFIQI, A. M., LEMKE, S., FERGUSON, S., STAUBER, M. & SCHMIDT-OTT, U. 2008. Evolutionary origin of the amnioserosa in cyclorrhaphan flies correlates with spatial and temporal expression changes of zen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 234-239.
- RAFIQI, A. M., LEMKE, S. & SCHMIDT-OTT, U. 2010. Postgastrular zen expression is required to develop distinct amniotic and serosal epithelia in the scuttle fly *Megaselia*. *Dev Biol*, 341, 282-90.
- RANGARAJAN, E. S. & IZARD, T. 2013. Dimer asymmetry defines alpha-catenin interactions. *Nat Struct Mol Biol*, 20, 188-93.

- RATHEESH, A., GOMEZ, G. A., PRIYA, R., VERMA, S., KOVACS, E. M., JIANG, K., BROWN, N. H., AKHMANOVA, A., STEHBENS, S. J. & YAP, A. S. 2012. Centralspindlin and alpha-catenin regulate Rho signalling at the epithelial zonula adherens. *Nat Cell Biol*, 14, 818-28.
- RAUSKOLB, C., SUN, S., SUN, G., PAN, Y. & IRVINE, K. D. 2014. Cytoskeletal tension inhibits Hippo signaling through an Ajuba-Warts complex. *Cell*, 158, 143-56.
- RAY, H. J. & NISWANDER, L. 2012. Mechanisms of tissue fusion during development. *Development*, 139, 1701-11.
- RICOS, M. G., HARDEN, N., SEM, K. P., LIM, L. & CHIA, W. 1999. Dcdc42 acts in TGF- β signaling during Drosophila morphogenesis: distinct roles for the Drac1/JNK and Dcdc42/TGF- β cascades in cytoskeletal regulation. *Journal of Cell Science*, 112, 1225-1235.
- RIESGO-ESCOVAR, J. R. & HAFEN, E. 1997. Drosophila Jun kinase regulates expression of decapentaplegic via the ETS-domain protein Aop and the AP-1 transcription factor DJun during dorsal closure. *Genes & Development*, 11, 1717-1727.
- RIMM, D. L., KOSLOV, E. R., KEBRAIEI, P., CIANCI, C. D. & MORROW, J. S. 1995. Alpha(E)-Catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 8813-8817.
- ROBINSON, D. N., SMITH-LEIKER, T. A., SOKOL, N. S., HUDSON, A. M. & COOLEY, L. 1997. Formation of the Drosophila Ovarian Ring Canal Inner Rim Depends on cheerio. *Genetics*, 145, 1063-1072.
- ROH-JOHNSON, M., SHEMER, G., HIGGINS, C. D., MCCLELLAN, J. H., WERTS, A. D., TULU, U. S., GAO, L., BETZIG, E., KIEHART, D. P. & GOLDSTEIN, B. 2012. Triggering a cell shape change by exploiting preexisting actomyosin contractions. *Science*, 335, 1232-5.
- ROPER, K. 2015. Integration of cell-cell adhesion and contractile actomyosin activity during morphogenesis. *Curr Top Dev Biol*, 112, 103-27.
- RUSHLOW, C., COLOSIMO, P. F., LIN, M., XU, M. & KIROV, N. 2001. Transcriptional regulation of the Drosophila gene zen by competing Smad and Brinker inputs. *Genes & Development*, 15, 340-351.
- SAIAS, L., SWOGER, J., D'ANGELO, A., HAYES, P., COLOMBELLI, J., SHARPE, J., SALBREUX, G. & SOLON, J. 2015. Decrease in Cell Volume Generates Contractile Forces Driving Dorsal Closure. *Dev Cell*, 33, 611-21.
- SARAVANAN, S., MEGHANA, C. & NARASIMHA, M. 2013. Local, cell-nonautonomous feedback regulation of myosin dynamics patterns transitions in cell behavior: a role for tension and geometry? *Mol Biol Cell*, 24, 2350-61.
- SARPAL, R., PELLIKKA, M., PATEL, R. R., HUI, F. Y., GODT, D. & TEPASS, U. 2012. Mutational analysis supports a core role for Drosophila alpha-catenin in adherens junction function. *J Cell Sci*, 125, 233-45.
- SAWYER, J. K., HARRIS, N. J., SLEP, K. C., GAUL, U. & PEIFER, M. 2009. The Drosophila afadin homologue Canoe regulates linkage of the actin cytoskeleton to adherens junctions during apical constriction. *J Cell Biol*, 186, 57-73.
- SCHMIDT-OTT, U., RAFIQI, A. M. & LEMKE, S. 2010. Chapter 10: Hox3/zen and the Evolution of Extraembryonic Epithelia in Insects. *Hox Genes: Studies from the 20th to the 21st Century*, 133-144.

- SCHÖCK, F. & PERRIMON, N. 2002. Cellular Processes Associated with Germ Band Retraction in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 248, 29-39.
- SEPPA, M. J., JOHNSON, R. I., BAO, S. & CAGAN, R. L. 2008. Polychaetoid controls patterning by modulating adhesion in the *Drosophila* pupal retina. *Dev Biol*, 318, 1-16.
- SHTUTMAN, M., CHAUSOVSKY, A., PRAGER-KHOUTORSKY, M., SCHIEFERMEIER, N., BOGUSLAVSKY, S., KAM, Z., FUCHS, E., GEIGER, B., BORISY, G. G. & BERSHADSKY, A. D. 2008. Signaling function of alpha-catenin in microtubule regulation. *Cell Cycle*, 7, 2377-83.
- SMITH, A. L., DOHN, M. R., BROWN, M. V. & REYNOLDS, A. B. 2012. Association of Rho-associated protein kinase 1 with E-cadherin complexes is mediated by p120-catenin. *Mol Biol Cell*, 23, 99-110.
- SOKOL, N. S. & COOLEY, L. 1999. *Drosophila* Filamin encoded by the cheerio locus is a component of ovarian ring canals. *Curr Biol*, 9, 1221-1230.
- SOKOL, N. S. & COOLEY, L. 2003. *Drosophila* filamin is required for follicle cell motility during oogenesis. *Developmental Biology*, 260, 260-272.
- SOLON, J., KAYA-COPUR, A., COLOMBELLI, J. & BRUNNER, D. 2009. Pulsed forces timed by a ratchet-like mechanism drive directed tissue movement during dorsal closure. *Cell*, 137, 1331-42.
- STALLER, M. V., YAN, D., RANDKLEV, S., BRAGDON, M. D., WUNDERLICH, Z. B., TAO, R., PERKINS, L. A., DEPACE, A. H. & PERRIMON, N. 2013. Depleting gene activities in early *Drosophila* embryos with the "maternal-Gal4-shRNA" system. *Genetics*, 193, 51-61.
- STOSSEL, T. P., CONDEELIS, J., COOLEY, L., HARTWIG, J. H., NOEGEL, A., SCHLEICHER, M. & SHAPIRO, S. S. 2001. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nature*, 2, 138-145.
- TADROS, W. & LIPSHITZ, H. D. 2009. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*, 136, 3033-42.
- TAKAI, Y., IKEDA, W., OGITA, H. & RIKITAKE, Y. 2008. The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 24, 309-42.
- TEPASS, U., GRUSZYNSKI-DEFEO, E., HAAG, T. A., OMATYAR, L., TÖRÖK, T. & HARTENSTEIN, V. 1996. shotgun encodes *Drosophila* E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neurectoderm and other morphogenetically active epithelia. *Genes & Development*, 10, 672-685.
- THIEVESSEN, I., THOMPSON, P. M., BERLEMONT, S., PLEVOCK, K. M., PLOTNIKOV, S. V., ZEMLJIC-HARPF, A., ROSS, R. S., DAVIDSON, M. W., DANUSER, G., CAMPBELL, S. L. & WATERMAN, C. M. 2013. Vinculin-actin interaction couples actin retrograde flow to focal adhesions, but is dispensable for focal adhesion growth. *J Cell Biol*, 202, 163-77.
- TORRES, M., STOYKOVA, A., HUBER, O., CHOWDHURY, K., BONALDO, P., MANSOURI, A., BUTZ, S., KEMLER, R. & GRUSS, P. 1997. An alpha-E-catenin gene trap mutation defines its function in preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 901-906.
- TOYAMA, Y., PERALTA, X. G., WELLS, A. R., KIEHART, D. P. & EDWARDS, G. S. 2008. Apoptotic force and tissue dynamics during *Drosophila* embryogenesis. *Science*, 321, 1683-6.

- TWISS, F., LE DUC, Q., VAN DER HORST, S., TABDILI, H., VAN DER KROGT, G., WANG, N., REHMANN, H., HUVENEERS, S., LECKBAND, D. E. & DE ROOIJ, J. 2012. Vinculin-dependent Cadherin mechanosensing regulates efficient epithelial barrier formation. *Biol Open*, 1, 1128-40.
- VALENCIA-EXPOSITO, A., GROSHEVA, I., MIGUEZ, D. G., GONZALEZ-REYES, A. & MARTIN-BERMUDO, M. D. 2016. Myosin light-chain phosphatase regulates basal actomyosin oscillations during morphogenesis. *Nat Commun*, 7, 10746.
- VANHOOK, A. & LETSOU, A. 2008. Head Involution in *Drosophila*: Genetic and Morphogenetic Connections to Dorsal Closure. *Developmental Dynamics*, 237, 28–38.
- VASIOUKHIN, V., BAUER, C., DEGENSTEIN, L., WISE, B. & FUCHS, E. 2001. Hyperproliferation and Defects in Epithelial Polarity upon Conditional Ablation of α -Catenin in Skin. *Cell*, 104, 605-617.
- VASQUEZ, C. G., TWOROGGER, M. & MARTIN, A. C. 2014. Dynamic myosin phosphorylation regulates contractile pulses and tissue integrity during epithelial morphogenesis. *J Cell Biol*, 206, 435-50.
- WADA, A., KATO, K., UWUO, M. F., YONEMURA, S. & HAYASHI, S. 2007. Specialized extraembryonic cells connect embryonic and extraembryonic epidermis in response to Dpp during dorsal closure in *Drosophila*. *Dev Biol*, 301, 340-9.
- WAHLSTROM, G., LAHTI, V. P., PISPA, J., ROOS, C. & HEINO, T. I. 2004. *Drosophila* non-muscle α -actinin is localized in nurse cell actin bundles and ring canals, but is not required for fertility. *Mech Dev*, 121, 1377-91.
- WAHLSTROM, G., NOROKORPI, H. L. & HEINO, T. I. 2006. *Drosophila* α -actinin in ovarian follicle cells is regulated by EGFR and Dpp signalling and required for cytoskeletal remodelling. *Mech Dev*, 123, 801-18.
- WANG, Q., FENG, J. J. & PISMEN, L. M. 2012a. A cell-level biomechanical model of *Drosophila* dorsal closure. *Biophys J*, 103, 2265-74.
- WANG, Y. C., KHAN, Z., KASCHUBE, M. & WIESCHAUS, E. F. 2012b. Differential positioning of adherens junctions is associated with initiation of epithelial folding. *Nature*, 484, 390-3.
- WATABE-UCHIDA, M., UCHIDA, N., IMAMURA, Y., NAGAFUCHI, A., FUJIMOTO, K., UEMURA, T., VERMEULEN, S., VAN ROY, F., ADAMSON, E. D. & TAKEICHI, M. 1998. α -Catenin-Vinculin Interaction Functions to Organize the Apical Junctional Complex in Epithelial Cells. *The Journal of Cell Biology*, 142, 847–857.
- WEISS, E. E., KROEMKER, M., RÜDIGER, A., JOCKUSCH, B. M. & RÜDIGER, M. 1998. Vinculin Is Part of the Cadherin–Catenin Junctional Complex: Complex Formation between α -Catenin and Vinculin. *The Journal of Cell Biology*, 141, 755–764.
- WELLS, A. R., ZOU, R. S., TULU, U. S., SOKOLOW, A. C., CRAWFORD, J. M., EDWARDS, G. S. & KIEHART, D. P. 2014. Complete canthi removal reveals that forces from the amnioserosa alone are sufficient to drive dorsal closure in *Drosophila*. *Mol Biol Cell*, 25, 3552-68.
- WOTTON, K. R., JIMENEZ-GURI, E., GARCIA MATHEU, B. & JAEGER, J. 2014. A staging scheme for the development of the scuttle fly *Megaselia abdita*. *PLoS One*, 9, e84421.

- XIE, S. & MARTIN, A. C. 2015. Intracellular signalling and intercellular coupling coordinate heterogeneous contractile events to facilitate tissue folding. *Nat Commun*, 6, 7161.
- XU, T. & RUBIN, G. M. 1993. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development*, 117, 1223-1237.
- YAMADA, S., POKUTTA, S., DREES, F., WEIS, W. I. & NELSON, W. J. 2005. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell*, 123, 889-901.
- YANG, J., DOKURNO, P., TONKS, N. K. & BARFORD, D. 2001. Crystal structure of the M-fragment of α -Catenin: implications for modulation of cell adhesion. *The EMBO Journal*, 20, 3645-3656.
- YAO, M., QIU, W., LIU, R., EFREMOV, A. K., CONG, P., SEDDIKI, R., PAYRE, M., LIM, C. T., LADOUX, B., MEGE, R. M. & YAN, J. 2014. Force-dependent conformational switch of α -catenin controls vinculin binding. *Nat Commun*, 5, 4525.
- YONEMURA, S., WADA, Y., WATANABE, T., NAGAFUCHI, A. & SHIBATA, M. 2010. α -Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nat Cell Biol*, 12, 533-42.
- YOUNG, P. E., RICHMAN, A. M., KETCHUM, A. S. & KIEHART, D. P. 1993. Morphogenesis in *Drosophila* requires nonmuscle myosin heavy chain function. *Genes & Development*, 7, 29-41.
- ZULUETA-COARASA, T., TAMADA, M., LEE, E. J. & FERNANDEZ-GONZALEZ, R. 2014. Automated multidimensional image analysis reveals a role for Abl in embryonic wound repair. *Development*, 141, 2901-11.

8. ANEXOS: Figuras Resultados, Suplementarias y Leyendas.

Figura R1. *Caracterización de la serie alélica para α -Catenina.* (A) Representación esquemática de las proteínas mutantes. (B) Alineamiento de secuencia de la región C-terminal mostrando la conservación de la Valina en la posición 851.

Figura R2. *Localización en la membrana de las formas mutantes de α -Catenina para los dominios VH2 y VH3.* (A-B) Expresión de α -Catenina de origen materno en embriones mutantes a-Cat1 en estadio de cierre dorsal, para embriones heterocigóticos (control; n=15) y homocigóticos (n=11) para a-Cat1. (i-i') Tinción para α -Catenina. (ii-ii') La heterocigosis es reconocida por la presencia de GFP en la línea *a-Cat1/TM3, Ser twi-Gal4 UAS-GFP*, y que utilizamos para visualizar los núcleos de las células de la amnioserosa. (iii-iii') Fusión de los 2 canales. (B) Cuantificación de los niveles de fluorescencia en la epidermis y la amnioserosa. La media entre los 2 genotipos se comparó usando el test no paramétrico Mann-Whitney: p-valor \leq 0,05*; p \leq 0,01**; p \leq 0,001***. (C) Clones mutantes homocigóticos para los distintos alelos de α -Catenina en el disco imaginal larvario de ala (estadio III). (i-i'') Imágenes de los discos mostrando la localización del clon. (ii-ii'') Tinción para α -Catenina. (iii-iii'') El clon es visualizado por la falta de GFP y es indicado con una línea punteada. (iv-iv'') Núcleos marcados con DAPI. (v-v'') Fusión de los 3 canales. Las barras de calibración son 25 μ m en A, 100 μ m en C (i-i'') y 10 μ m en C (ii-v'')

Figura R3. *Los niveles de proteína materna están afectados de manera diferencial en los embriones mutantes de α -Catenina.* (A) Inmuno Blot de α -Catenina y Tubulina en embriones mutantes para α -Catenina y embriones control (Oregon-R) durante el estadio de cierre dorsal. (B) Cuantificación de los niveles relativos al control de α -Catenina de 4 ensayos independientes, utilizando los niveles Tubulina como control de carga. (C) Cuantificación de los niveles relativos de proteína truncada respecto a la de tamaño completo. Los datos muestran la media \pm SE y se analizaron las diferencias estadísticas con la prueba T-Student: p-valor \leq 0,05*; p \leq 0,01**; p \leq 0,001***.

Figura R4. *El análisis cuticular revela letalidad embrionaria y agujeros en la región anterior en embriones mutantes para α -Catenina.* (A-E) Diferentes defectos cuticulares para los embriones mutantes dentro de cada categoría (0-4). (F) Cuantificación de los

defectos cuticulares para los diferentes alelos mutantes. (G) Diferencias estadísticas en la proporción de cada categoría relativo al número total de cutículas (z-ratio), comparando cada alelo mutante con el alelo nulo a través de la prueba T-Student: p-valor $\leq 0,01^*$; $p \leq 0,001^{**}$; $p \leq 0,0001^{***}$. La barra de calibración es de 100 μm en A-E.

Figura R5. *Defectos en la involución de la cabeza y el cierre dorsal en embriones mutantes para α -Catenina.* (A) Imágenes *in vivo* de películas *time-lapse* de un embrión DE-Cadherina::GFP (i-iv) y DE-Cadherina::GFP; α -Cat13/ α -Cat13 (i'-iv') a los tiempos indicados durante el cierre dorsal. La cresta dorsal está indicada en amarillo y el agujero anterior con una línea punteada de color magenta. La longitud de la amnioserosa del eje ML está indicado con una línea continua de color verde. La longitud del eje AP está indicado con una línea discontinua del mismo color y fue usada como referencia para calcular la mitad del eje ML cuando uno de los lados de la epidermis estaba fuera del plano de visualización. La barra de calibración representa 50 μm .

Figura R6. *Reducción de la velocidad del cierre dorsal para los mutantes de α -Catenina.* (A-E) Cuantificación de la longitud de la amnioserosa en su eje ML de simetría en 7 embriones silvestres (control) frente a 5 embriones α -Cat1 (A), 5 α -Cat13 (B), 5 α -Cat421 (C), 4 α -Cat2049 (D), y 5 $AS-Gal4 > UAS-\alpha-Cat^{RNAi} \times 2$ (E) y diferenciando cuando los embriones presentaban o no agujero en la región anterior (AH) o desarrollaban agujeros antero-dorsales (ADH). La curva correspondiente al control se muestra siempre en color negro. La comparación estadística se realizó respecto a los valores medios de la pendiente obtenida del análisis de regresión lineal, utilizando la prueba T-Student: p-valor $\leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$.

Figura R7. *La bajada de función con la expresión ectópica del ARNi para α -Catenina no muestra cambios en las células de la amnioserosa.* (A) Imagen de la tinción para α -Catenina de un embrión expresando $AS-Gal4$, DE-Cadherina::GFP>UAS- α -Cat^{RNAi} $\times 2$ donde se muestra el área analizada de la epidermis (círculo amarillo) y la amnioserosa (rectángulo verde). Tinción para α -Catenina (i) y fusión de los 2 canales (ii). (B) Cuantificación de los niveles de fluorescencia en la epidermis y la amnioserosa de embriones que expresan $AS-Gal4$, DE-Cadherina::GFP>UAS- α -Cat^{RNAi} $\times 2$ (n=8) y

embriones *AS-Gal4, DE-Cadherina::GFP* (n=10). La media entre los 2 genotipos se comparó usando el test no paramétrico Mann-Whitney: $p\text{-valor} \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$. La barra de calibración representa 50 μm .

Figura R8. *Incremento del número de delaminaciones en las células de la amnioserosa para los mutantes de α -Catenina.* (A) Imágenes de un ejemplo de célula de la amnioserosa delaminándose por el plano basal del tejido en un embrión *DE-Cadherina::GFP*, marcada en rojo. (B-D) Gráficos de puntos mostrando el número de delaminaciones por embrión (B), número de células al inicio del cierre dorsal por embrión (C) y número de delaminaciones relativas al número de células iniciales durante un período de tiempo de 200 minutos. Las líneas coloreadas indican la media y la desviación estándar para cada genotipo. La media para cada parámetro en cada genotipo mutante fue comparada con embriones silvestres usando la prueba T-Student: $p\text{-valor} \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$. La barra de calibración es de 10 μm en A.

Figura R9. *Desorganización de los filamentos de Actina en el leading-edge de embriones mutantes para α -Catenina.* Tinción de faloidina para embriones heterocigóticos *DE-Cadherina::GFP; α -Cat1/TM3, Ser twi-Gal4 UAS-GFP* (i-iv), embriones homocigóticos *DE-Cadherina::GFP; α -Cat1/ α -Cat1* (i'-iv') y *DE-Cadherina::GFP; α -Cat1/ α -Cat1* (i''-iv'') durante el cierre dorsal. Imágenes de los embriones mostrando el área ampliada (i-i''). Imágenes de las membranas apicales con el marcador *DE-Cadherina::GFP* (ii-ii'). Imágenes de los filamentos de Actina marcados con faloidina-TRITC (iii-iii''). Fusión de los 2 canales (iv-iv''). Las barras de calibración son 50 μm (i-i'') y 10 μm (ii-iv'').

Figura R10. *Deslocalización de Miosina en el leading-edge de embriones mutantes para α -Catenina.* Imágenes de Miosina marcada con el *protein-trap* para la cadena pesada de Miosina-II no muscular en embriones heterocigóticos *Zipper::YFP; α -Cat2049/TM3, Ser twi-Gal4 UAS-GFP* (i-iv), embriones homocigóticos *Zipper::YFP; α -Cat2049/ α -Cat2049* (i'-iv') durante el cierre dorsal. Imágenes de los embriones mostrando el área ampliada (i-i'). Imágenes para el cable marcado con *Zipper::YFP* (ii-ii'). Imágenes de las

membranas apicales y del leading-edge con el marcador DE-Cadherina::GFP (iii-iii'). Fusión de los 2 canales (iv-iv'). Las barras de calibración son 50 μ m (i-i') y 25 μ m (ii-iv').

Figura R11. El cierre en cremallera posterior está afectado en los mutantes de α -Catenina. (A) Imágenes *in vivo* de películas *time-lapse* de embriones control DE-Cadherina::GFP (i-i'''), DE-Cadherina::GFP; α -Cat1 (ii-ii'''), DE-Cadherina::GFP; α -Cat13 (iii-iii'''), DE-Cadherina::GFP; α -Cat2049 (iv-iv''') y DE-Cadherina::GFP; α -Cat421 (v-v''') alineados temporalmente (t0). El comienzo del proceso de cierre en cremallera posterior está marcado con un asterisco verde (i'-v') y la distancia de referencia para calcular la velocidad relativa en magenta (i''-v''). (B) Tabla que indica el número de embriones analizados, el tiempo de comienzo, el porcentaje completado del cierre anterior y posterior. Asimismo, se indica cuando se desarrollan agujeros anteriores (AH, categoría cuticular nº2) y agujeros antero-dorsales (ADH, categoría cuticular nº3). (C) Gráfico de distribución por puntos de los valores para el tiempo de comienzo del cierre en cremallera posterior. (D) Gráfico de distribución por puntos de los valores para la velocidad del cierre en cremallera posterior. Las líneas coloreadas indican la media y la desviación estándar para cada genotipo. La media para cada parámetro en cada genotipo mutante fue comparada con embriones silvestres usando la prueba T-Student: $p\text{-valor} \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$. La barra de calibración es de 50 μ m en A.

Figura R12. Las proteínas truncadas de α -Catenina no interaccionan con el citoesqueleto de actomiosina. (A) Análisis cuticular de los diferentes embriones mutantes sobre-expresando una forma fosfomimética de la cadena reguladora de Miosina (*sqhDD*). Las diferentes categorías fenotípicas quedan definidas en la leyenda. (B) Diferencias estadísticas en la proporción de cada categoría relativa al número total de cutículas (z-ratio), comparando cada alelo mutante al que se sobre-expresó *sqhDD* respecto a su condición mutante a través de la prueba T-Student: $p\text{-valor} \leq 0,01^*$; $p \leq 0,001^{**}$; $p \leq 0,0001^{***}$. (C) Imágenes *in vivo* a distintos tiempos de embriones control DE-Cadherina::GFP (i-iii), AS-Gal4, DE-Cadherina::GFP>UAS-*sqhDD* (i'-iii'), DE-Cadherina::GFP; α -Cat¹/ α -Cat¹ (i''-iii'') y AS-Gal4, DE-Cadherina::GFP>UAS-*sqhDD*; α -Cat¹/ α -Cat¹ (i'''-iii'''). La línea discontinua roja marca las roturas en la región anterior del embrión. La barra de calibración es de 25 μ m en C.

Figura R13. *Incremento del ciclo de oscilación y de la amplitud en las células de la amnioserosa de embriones mutantes para α -Catenina.* (A-B) Análisis de las fluctuaciones del radio celular en datos agrupados para 7 embriones control *DE-Cadherina::GFP* (i-i'), 4 embriones *DE-Cadherina::GFP; a-Cat1/a-Cat1* (ii-ii'''), 4 *DE-Cadherina::GFP; a-Cat13/a-Cat13* (iii-iii'''), 4 *DE-Cadherina::GFP; a-Cat2049/a-Cat2049* (iv-iv''') y 5 *DE-Cadherina::GFP; a-Cat421/a-Cat421* (v-v''') alineados temporalmente. (A) Duración media del ciclo de oscilación de las células de la amnioserosa como función de su localización en el eje AP a lo largo del tiempo del cierre dorsal (i-v). La región anterior (-100 μ m) se localiza a la izquierda en todos los paneles similares. Las líneas blancas continuas y discontinuas en la situación control (i-i') indica la transición entre las diferentes fases de contracción. Esquema mostrando la longitud del ciclo de oscilación del área apical de la célula (vi). Comparación estadística de la duración del ciclo de oscilación entre embriones control y los diferentes embriones mutantes (vii-x). Para el análisis estadístico se estableció el límite temporal de 75 μ m para descartar una posible influencia de los defectos en ambos extremos de la amnioserosa. El área sombreada corresponde a las regiones estadísticamente significativas aplicando el modelo lineal-mixto con un p -valor $\leq 0,05$ (mirar M&M) en todos los gráficos similares. (B) Amplitud proporcional media de las células de la amnioserosa como función de su localización en el eje AP a lo largo del tiempo del cierre dorsal (i'-v'). Esquema mostrando la amplitud del ciclo de oscilación del área apical de la célula (vi'). Comparación estadística de la amplitud proporcional del ciclo de oscilación entre embriones control y los diferentes embriones mutantes (vii'-x'). La amplitud proporcional hace referencia al porcentaje del radio apical de la célula.

Figura R14. *Incremento del ciclo de expansión en las células de la amnioserosa de embriones mutantes para α -Catenina.* (A-C) Análisis de las fluctuaciones del radio celular en datos agrupados para 7 embriones control *DE-Cadherina::GFP* (i-i'), 4 embriones *DE-Cadherina::GFP; a-Cat1/a-Cat1* (ii-ii'''), 4 *DE-Cadherina::GFP; a-Cat13/a-Cat13* (iii-iii'''), 4 *DE-Cadherina::GFP; a-Cat2049/a-Cat2049* (iv-iv''') y 5 *DE-Cadherina::GFP; a-Cat421/a-Cat421* (v-v''') alineados temporalmente. (A) Duración media del ciclo de contracción de las células de la amnioserosa como función de su localización en el eje AP a lo largo del tiempo del cierre dorsal (i-v). Las líneas blancas

continuas y discontinuas en la situación control (i-i') indica la transición entre las diferentes fases de contracción. Esquema mostrando la longitud del ciclo de contracción del área apical de la célula (vi). Comparación estadística de la duración del ciclo de contracción entre embriones control y los diferentes embriones mutantes (vii-x). Para el análisis estadístico se estableció el límite temporal de 75 μm para descartar una posible influencia de los defectos en ambos extremos de la amnioserosa. El área sombreada corresponde a las regiones estadísticamente significativas aplicando el modelo linear-mixto con un $p\text{-valor} \leq 0,05$ (mirar M&M) en todos los gráficos similares. (B) Duración media del ciclo de expansión de las células de la amnioserosa como función de su localización en el eje AP a lo largo del tiempo del cierre dorsal (i'-v'). Esquema mostrando la longitud del ciclo de expansión del área apical de la célula (vi'). Comparación estadística de la duración del ciclo de expansión entre embriones control y los diferentes embriones mutantes (vii'-x'). (C) Comparación estadística de la duración del ciclo de expansión respecto al ciclo de contracción para los embriones control y los diferentes embriones mutantes.

Figura R15. Las células de la amnioserosa presentan una apariencia corrugada en los mutantes para los dominios VH2 y VH3 truncados. (A) Imágenes *in vivo* de películas *time-lapse* de un embrión DE-Cadherina::GFP (i-iii) y DE-Cadherina::GFP; a-Cat421/a-Cat421 (i'-iii') a los tiempos indicados durante el cierre dorsal. (B) Logaritmo del cociente del perímetro celular entre el área celular de las células de la amnioserosa para 7 embriones control DE-Cadherina::GFP (i-i'), 4 embriones DE-Cadherina::GFP; a-Cat1/a-Cat1 (ii-ii'''), 4 DE-Cadherina::GFP; a-Cat13/a-Cat13 (iii-iii'''), 4 DE-Cadherina::GFP; a-Cat2049/a-Cat2049 (iv-iv''') y 5 DE-Cadherina::GFP; a-Cat421/a-Cat421 (v-v''') en función del eje AP a lo largo del tiempo. Esquema mostrando la relación entre el perímetro celular y el área apical de la célula (vi). Comparación estadística de la duración del ciclo de contracción entre embriones control y los diferentes embriones mutantes (vii-x). La barra de calibración es de 50 μm en A.

Figura R16. Defectos en el desplazamiento máximo de la membrana apical de las células de la amnioserosa para los mutantes del dominio VH3 truncado. (A) Imágenes *in vivo* de películas *time-lapse* de embriones control DE-Cadherina::GFP (i-iii) y DE-Cadherina::GFP; a-Cat2049/a-Cat2049 (i'-iii') 2 segundos antes y 12 segundos después

de la ablación y como imagen comparando las membranas antes (verde) y después de la ablación (morado). La longitud del corte fue de 20 μm en el eje AP del embrión. Los puntos numerados muestran un ejemplo de los vértices analizados, que corresponden a los más próximos al área de la lesión. (B) Esquema que representa el módulo Kelvin-Voigt del modelo visco-elástico. (C) Ejemplo de la distribución exponencial del desplazamiento máximo a lo largo del tiempo para los vértices de las membranas en un embrión control (i) y a-Cat2049 (ii). (D-E) Representación de la velocidad inicial (V), el desplazamiento máximo (D) y el tiempo en que se éste se hace constante (T) para estadios temprano y tardío del cierre en embriones control (verde) y embriones mutantes a-Cat2049 (morado). La media para cada parámetro en los embriones mutantes (16 vértices de 8 embriones tempranos y 21 vértices de 8 embriones tardíos) fue comparada con embriones silvestres (26 vértices de 12 embriones tempranos y 31 vértices de 11 embriones tardíos) usando la prueba T-Student: $p\text{-valor} \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$. La barra de calibración es de 10 μm en A.

Figura R17. *a-Catenina regula la dinámica de los focos de Actina en las células de la amnioserosa.* (A) Imágenes in vivo de películas time-lapse de un ejemplo de embrión control sGMCA (i-viii) y sGMCA; a-Cat13/a-Cat13 (i'-viii'), donde el foco de Actina está indicado con una flecha verde. (B-D) Representación del ciclo de duración del foco de Actina (B), el tiempo de intervalo entre focos consecutivos (C) y la duración del foco (D) de embriones control (188 focos de 6 embriones), sGMCA; a-Cat1/a-Cat1 (143 focos de 5 embriones), sGMCA; a-Cat13/a-Cat13 (158 focos de 5 embriones), sGMCA; a-Cat2049/a-Cat2049 (112 focos de 4 embriones) y sGMCA; a-Cat421/a-Cat421 (86 focos de 5 embriones). Mirar también la Tabla S1. La media (diamante) y la mediana (línea) están indicadas en el *box-plot* dentro de cada *violin-plot*. La media entre los diferentes mutantes se comparó con embriones silvestre usando el test no paramétrico Mann-Whitney: $p\text{-valor} \leq 0,05^*$; $p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$; $p \leq 0,0001^{****}$. La barra de calibración es 10 μm .

Figura R18. *a-Catenina regula la estabilidad de las uniones adherentes a través de la dinámica del citoesqueleto de Actina.* (A) Imágenes in vivo de películas time-lapse de un ejemplo de embrión sGMCA; shg^{g317} (i-viii), donde el foco de Actina está indicado con una flecha verde. (B-D) Representación del ciclo de duración del foco de Actina (B),

el tiempo de intervalo entre focos consecutivos (C) y la duración del foco (D) de embriones sGMCA; shg^{g317} (40 focos de 4 embriones). Mirar también Tabla S1. (E) Imagen *in vivo* de películas time-lapse de un ejemplo de embrión control DE-Cadherina::GFP 4 segundos antes y 180 segundos después del tiempo de la lesión. (F-H) Análisis FRAP de embriones DE-Cadherina::GFP (11 células de 7 embriones tempranos y 13 células de 7 embriones tardíos), a-Catenina::YFP (12 células de 5 embriones tempranos y 18 células de 8 embriones tardíos) y DE-Cadherina::GFP; a-Cat2049/a-Cat2049. La media para genotipo fue comparada entre embriones tempranos y tardíos usando la prueba T-Student: p-valor \leq 0,05*; p \leq 0,01**; p \leq 0,001***. La barra de calibración es de 10 μ m en A.

Figura R19. *Los niveles de Vinculina se incrementan en la membrana apical de las células de la amnioserosa dependiente de tensión.* (A) Imágenes *in vivo* de embriones AS-Gal4, DE-Cadherina::mTomato>UAS-Vinculina::YFP (i-viii), c381Gal4, DE-Cadherina::mTomato>UAS-Vinculina::YFP>UAS-MbsN300 (i'-viii') y c381Gal4, DE-Cadherina::mTomato>UAS-Vinculina::YFP>UAS-ctMLCK (i''-viii''), durante el cierre dorsal temprano (i-iv'') y tardío (v-viii''). (B) Localización de Vinculina::GFP en las células de la amnioserosa en embriones tempranos y tardíos del cierre dorsal (i-ii). (E) Localización de DE-Cadherina::mTomato (i') y Vinculina::GFP (ii') en embriones tempranos del cierre dorsal en los que se ha expresado ectópicamente la forma constitutivamente activa de MLCK en las células de la amnioserosa. La barra de calibración es de 25 μ m en A..

Figura R20. *a-Catenina interacciona genéticamente con Vinculina en el embrión de Drosophila.* (A) Análisis cuticular de embriones doblemente homocigóticos para mutante de Vinculina y los diferentes alelos de a-Catenina. Las diferentes categorías fenotípicas quedan definidas en la leyenda. (B) Localización *in vivo* de Vinculina en las membranas de las células de la amnioserosa en embriones Vinculina::GFP; a-Cat2049 (i) y Vinculina::GFP; a-Cat421 (ii) en estadio tardío del cierre dorsal y con agujero en la región anterior del embrión. (C) Diferencias estadísticas en la proporción de cada categoría relativa al número total de cutículas (z-ratio), comparando cada alelo mutante doble para Vinculina y a-Catenina con el correspondiente alelo mutante para

a-Catenina a través de la prueba T-Student: $p\text{-valor} \leq 0,01^*$; $p \leq 0,001^{**}$; $p \leq 0,0001^{***}$. La barra de calibración es de 10 μm en B.

Figura R21. *a-Catenina es requerida en las uniones adherentes tanto en las células de la amnioserosa como en la epidermis.* (A-B) Expresión temporal de la línea Gal4 específica de la amnioserosa (A) y la línea general del ectodermo del embrión en el momento del cierre dorsal (B). El marcaje verde indica la expresión del linaje para el Gal4 (i-i'), el rojo la expresión a tiempo real (ii-ii') y la fusión de los 2 canales (iii-iii'). (C-D) Análisis cuticular de embriones a los que se ha expresado ubi-DE-Cadherina, UAS-a-Catenina::GFP y la fusión UAS-DE-Cad::a-Cat en la amnioserosa y en el ectodermo para un fondo mutante de a-Cat1 (C) y a-Cat2049 (D). Las diferentes categorías fenotípicas quedan definidas en la leyenda. (E-F) Diferencias estadísticas en la proporción de cada categoría relativa al número total de cutículas (z-ratio), comparando cada experimento de sobre-expresión en fondo mutante con el correspondiente alelo mutante para a-Catenina a través de la prueba T-Student: $p\text{-valor} \leq 0,01^*$; $p \leq 0,001^{**}$; $p \leq 0,0001^{***}$. La barra de calibración es de 50 μm en A-B.

Figura R22. *Antagonismo de la función de a-Catenina y el complejo Arp2/3 en las células de la amnioserosa.* (A) Imágenes in vivo de embriones AS-Gal4, DE-Cadherina::GFP expresando UAS-WASpMyr (i), UAS-WASpMyr y UAS-a-Catenina::GFP (ii), UAS-WASpMyr y UAS-DE-Cadherina::GFP (iii). (B) Imágenes in vivo de embriones prd-Gal4, DE-Cadherina::GFP expresando UAS-WASpMyr (i'), UAS-WASpMyr y UAS-a-Catenina::GFP (ii'), UAS-WASpMyr y UAS-DE-Cadherina::GFP (iii'). Los asteriscos verdes indican células de tamaño más grande por la expresión de los transgenes. (C) Imágenes in vivo de embriones AS-Gal4, DE-Cadherina::GFP expresando UAS-WASpWT (i), UAS-WASpWT y UAS-a-Catenina::GFP (ii), UAS-WASpMyr y UAS-a-Catenina^{RNAi} (iii). (D-E) Tinciones para WASp en embriones AS-Gal4, DE-Cadherina::GFP > UAS-WASpWT (D) donde se observa el aumento de los niveles de WASp en la membrana de las células de la amnioserosa y en embriones silvestre (E). Expresión de DE-Cadherina (i'''-i'''''). Expresión de WASp (ii'''-ii'''''). Fusión de los 2 canales (iii'''-iii'''''). La barra de calibración es 50 μm .

Figura R23. *Localización diferencial de Filamina y α -Actinina en las células de la amnioserosa.* (A) Tinción para α -Actinina y Armadillo en embriones sqhAX3; sqh::GFP donde se muestra la localización en la amnioserosa (i-v) y la epidermis lateral (i'-v'). Nótese la localización de α -Actinina alternando con la localización de Miosina en el leading-edge, marcado con una flecha amarilla (B) Tinción con Faloidina y Zipper en embriones Cheerio::YFP donde se muestra la localización de Filamina en la amnioserosa (i-v) y la epidermis lateral (i'-v'). Nótese la co-localización de los focos de Miosina y Actina con los de Filamina, marcado con un asterisco amarillo. (C) Imágenes in vivo de películas time-lapse de embriones Cheerio::YFP donde se aprecia la dinámica de los focos, marcados con una flecha amarilla. Las barras de calibración son 10 μ m.

Figura R24. *Localización diferencial de Filamina y α -Actinina en las células del surco ventral del futuro mesodermo.* (A) Tinción para α -Actinina y Armadillo en embriones sqhAX3; sqh::GFP donde se muestra la localización en las células del surco ventral y la proyección ortogonal de la región delimitada por la línea amarilla (i-iv). Nótese la localización de α -Actinina en las membranas pero sin co-localizar con la Miosina medio-apical, marcada con asterisco amarillo (B) Tinción con Faloidina y Zipper en embriones Cheerio::YFP donde se muestra la localización de Filamina en las células del surco ventral y la proyección ortogonal de la región delimitada por la línea amarilla (i-iv). Nótese la co-localización de Miosina y Actina con Filamina. (C) Imágenes in vivo de películas time-lapse de embriones Cheerio::YFP donde se aprecia el enriquecimiento medio-apical en el momento de la gastrulación y de manera similar al de Miosina (A), marcado con un asterisco amarillo. (D) Imágenes in vivo de películas time-lapse de embriones silvestres sqhAX3; sqh::GFP, Gap43::mCh a los que se ha sobre-expresado el shRNAi de α -Actinina (i'-iii') y Filamina (i''-iii'') con las líneas maternales-Gal4. (E) Imágenes in vivo de películas time-lapse de embriones silvestres sqhAX3; sqh::GFP, Gap43::mCh a los que se ha micro-inyectado el dsDNA de α -Actinina (i'-iii') y Filamina (i''-iii'') con las líneas maternales-Gal4. Nótese el aumento de tamaño en las células ventrales con el shRNAi de Filamina y el dsDNA de α -Actinina, marcadas con un asterisco amarillo. Las barras de calibración son 10 μ m.

LEYENDAS PARA FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura S1. *Alineamiento temporal de embriones control durante el cierre dorsal de Drosophila.* (A) Imágenes in vivo de las películas time-lapse de embriones control *DE-Cadherina::GFP* con los tiempos de comienzo y final del proceso para cada embrión analizado. (B-E) Parámetros con evolución estereotípica durante el cierre dorsal: área celular (B), la anisotropía en la forma celular, positiva si está orientada en la dirección ML (C), la longitud celular en el eje ML (D) y la velocidad de deformación del tejido (E). Las barras de calibración es de 50 μm .

Figura S2. *Alineamiento temporal de embriones mutantes α -Cat1 durante el cierre dorsal de Drosophila.* (A) Imágenes in vivo de las películas time-lapse de embriones control *DE-Cadherina::GFP; α -Cat1/ α -Cat1* con los tiempos de comienzo y final del proceso para cada embrión analizado. (B-E) Parámetros con evolución estereotípica durante el cierre dorsal: área celular (B), la anisotropía en la forma celular, positiva si está orientada en la dirección ML (C), la longitud celular en el eje ML (D) y la velocidad de deformación del tejido (E). Las barras de calibración es de 50 μm .

Figura S3. *Alineamiento temporal de embriones mutantes α -Cat13 durante el cierre dorsal de Drosophila.* (A) Imágenes in vivo de las películas time-lapse de embriones control *DE-Cadherina::GFP; α -Cat13/ α -Cat13* con los tiempos de comienzo y final del proceso para cada embrión analizado. (B-E) Parámetros con evolución estereotípica durante el cierre dorsal: área celular (B), la anisotropía en la forma celular, positiva si está orientada en la dirección ML (C), la longitud celular en el eje ML (D) y la velocidad de deformación del tejido (E). Las barras de calibración es de 50 μm .

Figura S4. *Alineamiento temporal de embriones mutantes α -Cat2049 durante el cierre dorsal de Drosophila.* (A) Imágenes in vivo de las películas time-lapse de embriones control *DE-Cadherina::GFP; α -Cat2049/ α -Cat2049* con los tiempos de comienzo y final del proceso para cada embrión analizado. (B-E) Parámetros con evolución estereotípica durante el cierre dorsal: área celular (B), la anisotropía en la forma celular, positiva si está orientada en la dirección ML (C), la longitud celular en el eje ML (D) y la velocidad de deformación del tejido (E). Las barras de calibración es de 50 μm .

Figura S5. *Alineamiento temporal de embriones mutantes α -Cat421 durante el cierre dorsal de Drosophila.* (A) Imágenes in vivo de las películas time-lapse de embriones

control *DE-Cadherina::GFP*; *a-Cat421/a-Cat421* con los tiempos de comienzo y final del proceso para cada embrión analizado. (B-E) Parámetros con evolución estereotípica durante el cierre dorsal: área celular (B), la anisotropía en la forma celular, positiva si está orientada en la dirección ML (C), la longitud celular en el eje ML (D) y la velocidad de deformación del tejido (E). Las barras de calibración es de 50 μm .

Figura S6. *Alineamiento temporal de embriones control DE-Cadherina::GFP y mutantes para a-Catenina.* Los embriones fueron alineados temporalmente de acuerdo a la evolución estereotípica de 4 parámetros: área celular (i-v), la anisotropía en la forma celular, positiva si está orientada en la dirección ML (i'-v'), la longitud celular en el eje ML (i''-v'') y la velocidad de deformación del tejido (i'''-v'''). Para cada parámetro se representa la media y el error estándar de cada genotipo (vi-vi''')

Figura S7. *Área y perímetro de las células de la amnioserosa de embriones mutantes para a-Catenina.* (A-C) Análisis del área celular en datos agrupados para 7 embriones control *DE-Cadherina::GFP* (i-i'), 4 embriones *DE-Cadherina::GFP*; *a-Cat1/a-Cat1* (ii-ii'''), 4 *DE-Cadherina::GFP*; *a-Cat13/a-Cat13* (iii-iii'''), 4 *DE-Cadherina::GFP*; *a-Cat2049/a-Cat2049* (iv-iv''') y 5 *DE-Cadherina::GFP*; *a-Cat421/a-Cat421* (v-v''') alineados temporalmente. (A) Área celular media de las células de la amnioserosa como función de su localización en el eje AP a lo largo del tiempo del cierre dorsal (i-v). Comparación estadística del área celular de embriones control y los diferentes embriones mutantes (vi-ix). El área sombreada corresponde a las regiones estadísticamente significativas aplicando el modelo linear-mixto con un $p\text{-valor} \leq 0,05$ (mirar M&M) en todos los gráficos similares. (B) Perímetro celular medio de las células de la amnioserosa como función de su localización en el eje AP a lo largo del tiempo del cierre dorsal (i'-v'). Comparación estadística de perímetro celular de embriones control y los diferentes embriones mutantes (vi'-ix').

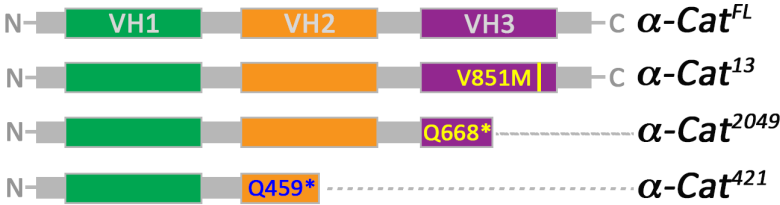
Figura S8. *Gráficos de distribución de los focos de Actina para cada genotipo.* (A) Duración de los focos de Actina para embriones control sGMCA (i), sGMCA; *a-Cat1/a-Cat1* (ii), sGMCA; *a-Cat13/a-Cat13* (iii), sGMCA; *a-Cat2049/a-Cat2049* (iv) y sGMCA; *a-Cat421/a-Cat421* (v). (B) Duración de los focos de Actina para embriones control (i'), sGMCA; *a-Cat1/a-Cat1* (ii'), sGMCA; *a-Cat13/a-Cat13* (iii'), sGMCA; *a-Cat2049/a-*

Cat2049 (iv') y sGMCA; a-Cat421/a-Cat421 (v'). La media (diamante) y la mediana (línea) están indicadas en el *box-plot* dentro de cada *violin-plot*.

Figura S9. *La estabilización de DE-Cadherina no se produce en embriones mutantes a-Catenina.* (A) Comparación estadística del ensayo FRAP entre embriones DE-Cadherina::GFP y DE-Cadherina::GFP; a-Cat2049/a-Cat2049 de estadíos temprano (i) y tardío (ii). (B) Tabla con los valores de los parámetros A (fracción móvil) y b ($\ln 2/\tau_{1/2}$, siendo $\tau_{1/2}$ el instante de tiempo para el que se llega a una recuperación media de la intensidad de fluorescencia) para los diferentes genotipos.

Tabla S1. Dinámica de los focos de Actina (media \pm desviación estándar / p-valor) en células de la amnioserosa de embriones control, mutantes para a-Catenina y shg^{g317}.

A



B

α -cat2	Homsap	859	LDSATSLIQAAKNLMNAVVLTVKASY	V	ASTKYQK	892
α -cat2	5 maml		LDSATSLIQAAKNLMNAVVLTVKASY	V	ASTKYQK	
α -cat2	Galgal	812	LDSATSLIQAAKNLMNAVVLTVKASY	V	ASTKYQK	845
α -cat2	Danrer	771	LDSATSLIQAAKNLMNAVVLTVKASY	V	ASTKYQK	804
α -cat2	Xentro	872	LDSATSLIQAAKNLMNAVVLTVKASY	V	ASTKYQK	905
α -cat	Dromel	825	LDSATSLIQAAKNLMNAVVLTVKYSY	V	ASTKYTR	858
α -cat	Anogam	817	LDSATSLIQAAKNLMNAVVYTVKYSY	V	ASTKYTR	850
HMP-1	Caele	818	LDSAMSLIQTARNLTVAVVQTVKAA	I	ASTKFRR	851
**** *:::*.*** ** :*:***:						

Fig. R1

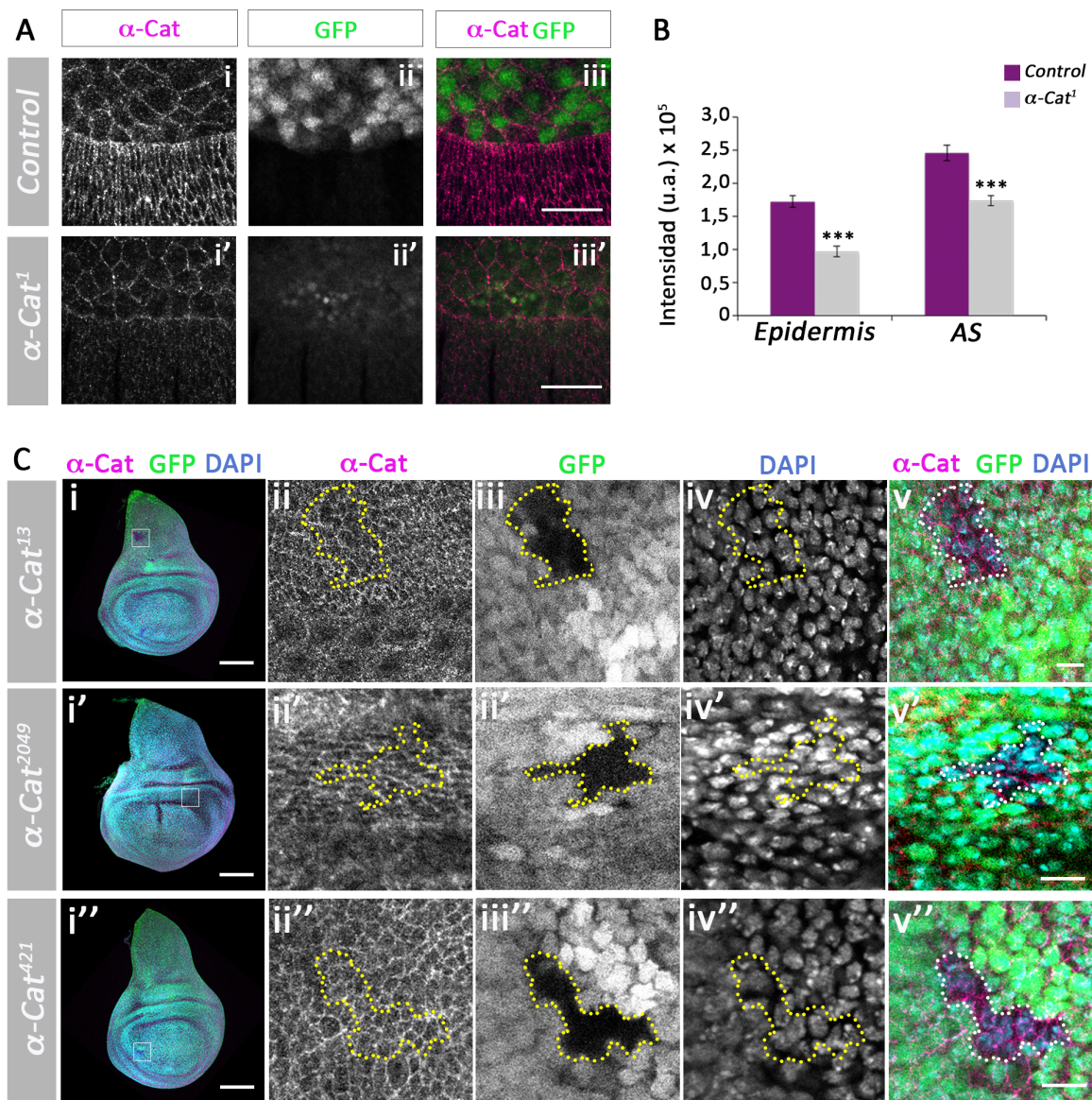


Fig. R2

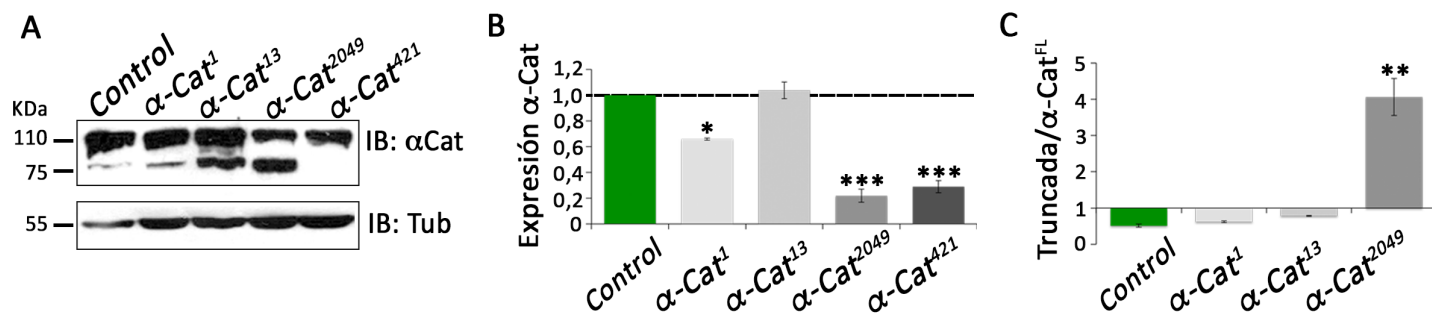


Fig. R3

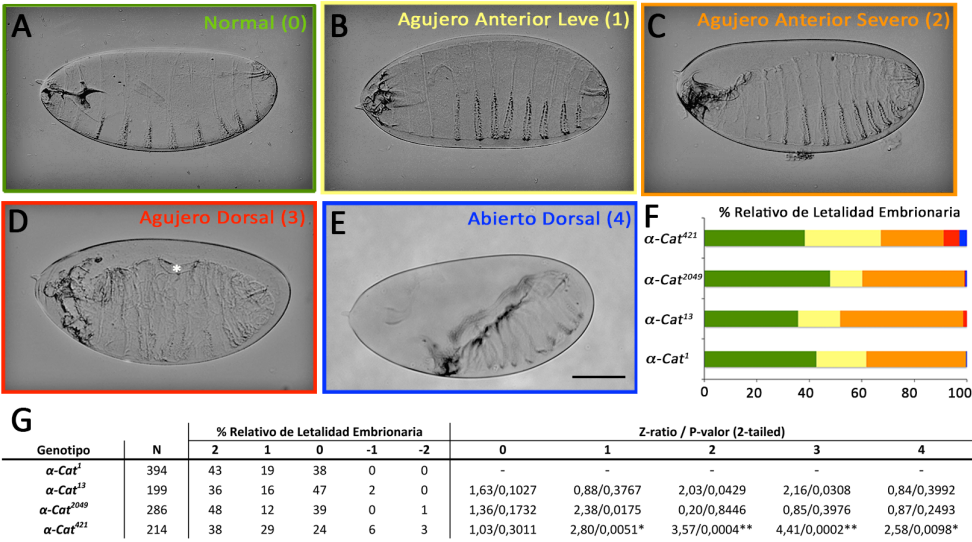


Fig. R4

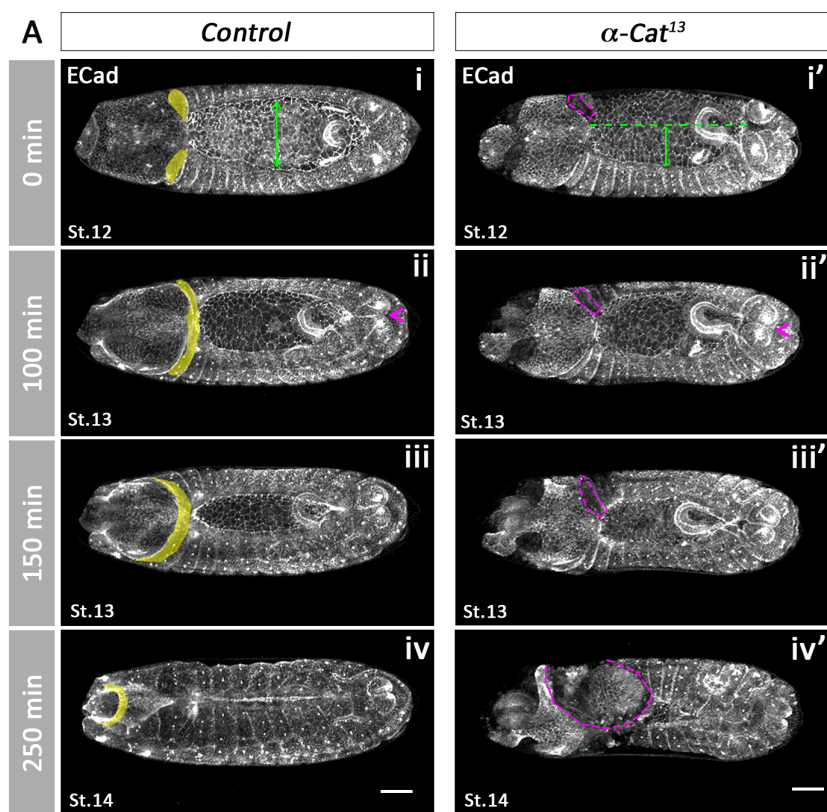


Fig. R5

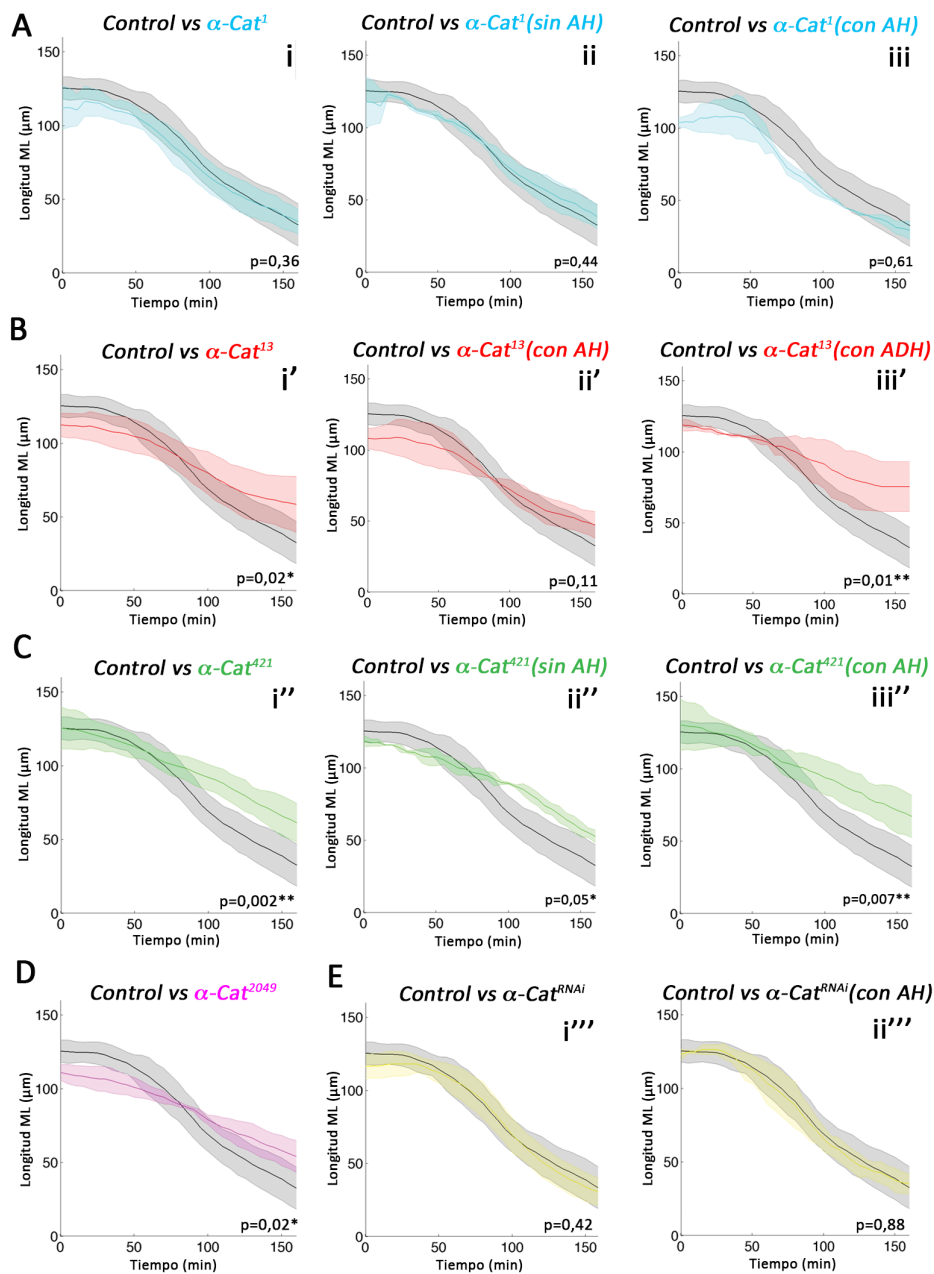


Fig. R6

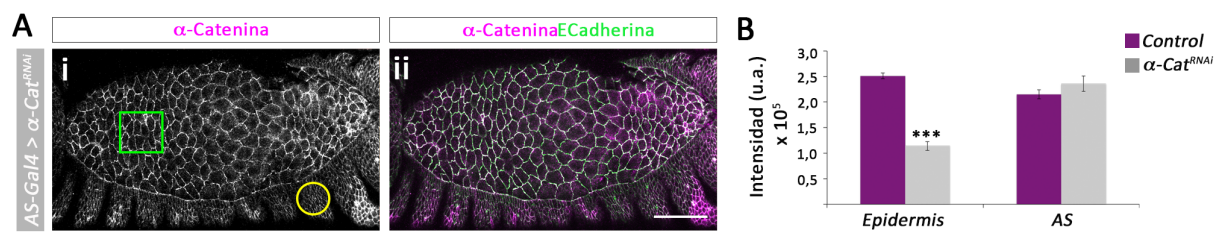


Fig. R7

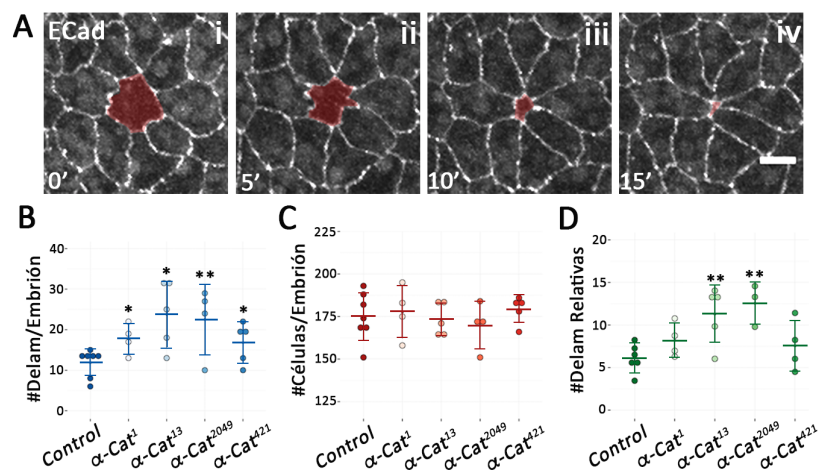


Fig. R8

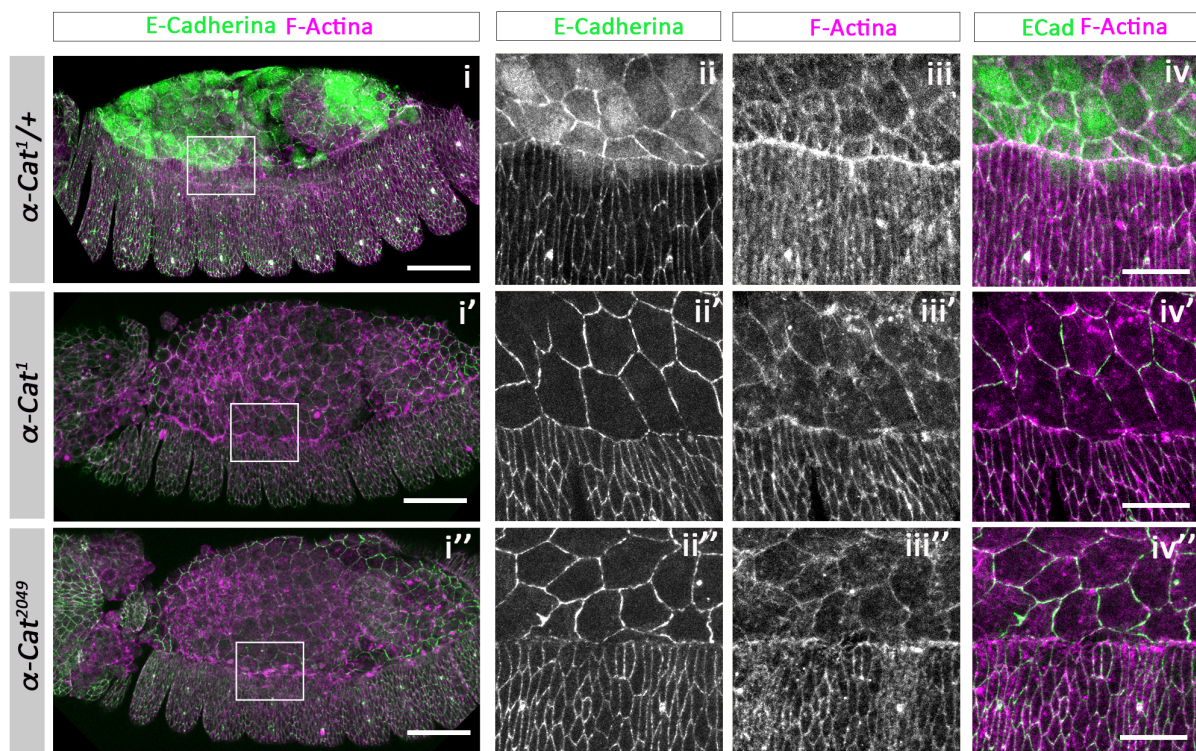


Fig. R9

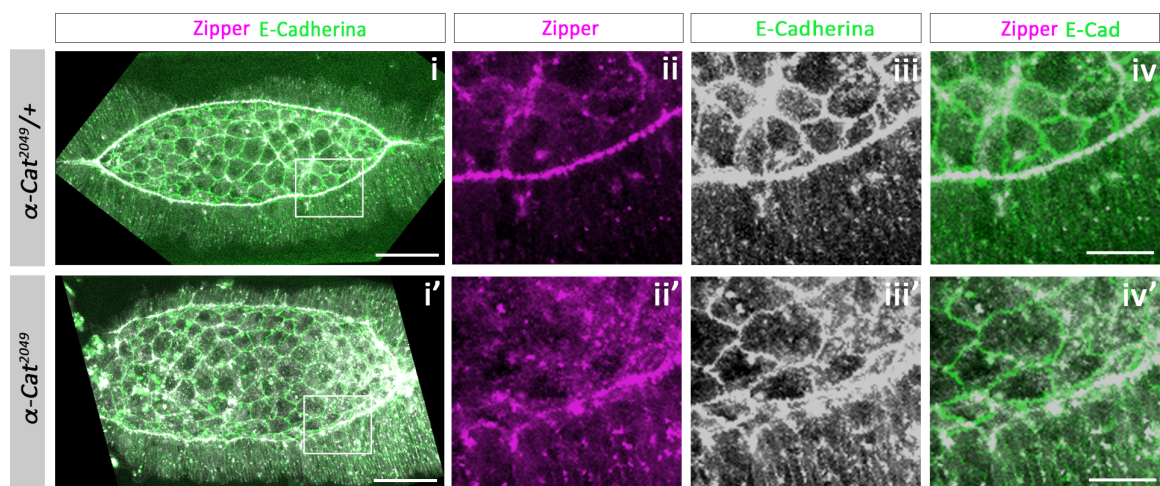


Fig. R10

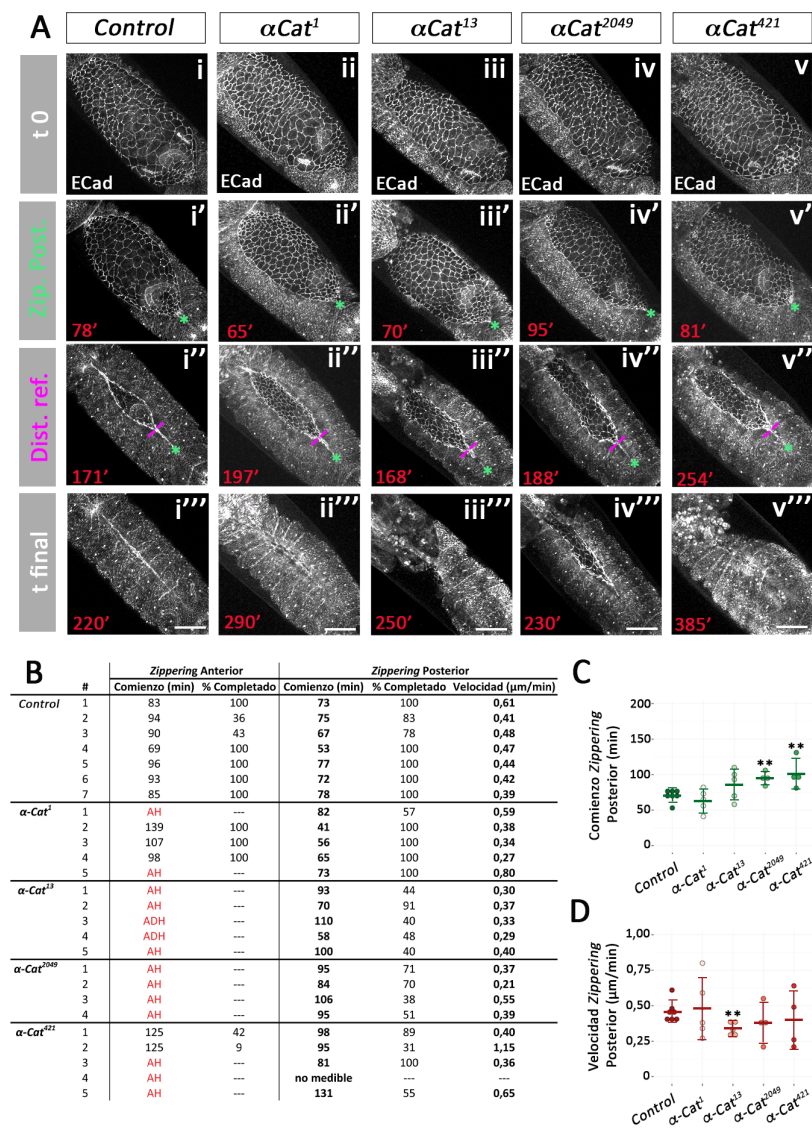


Fig. R11

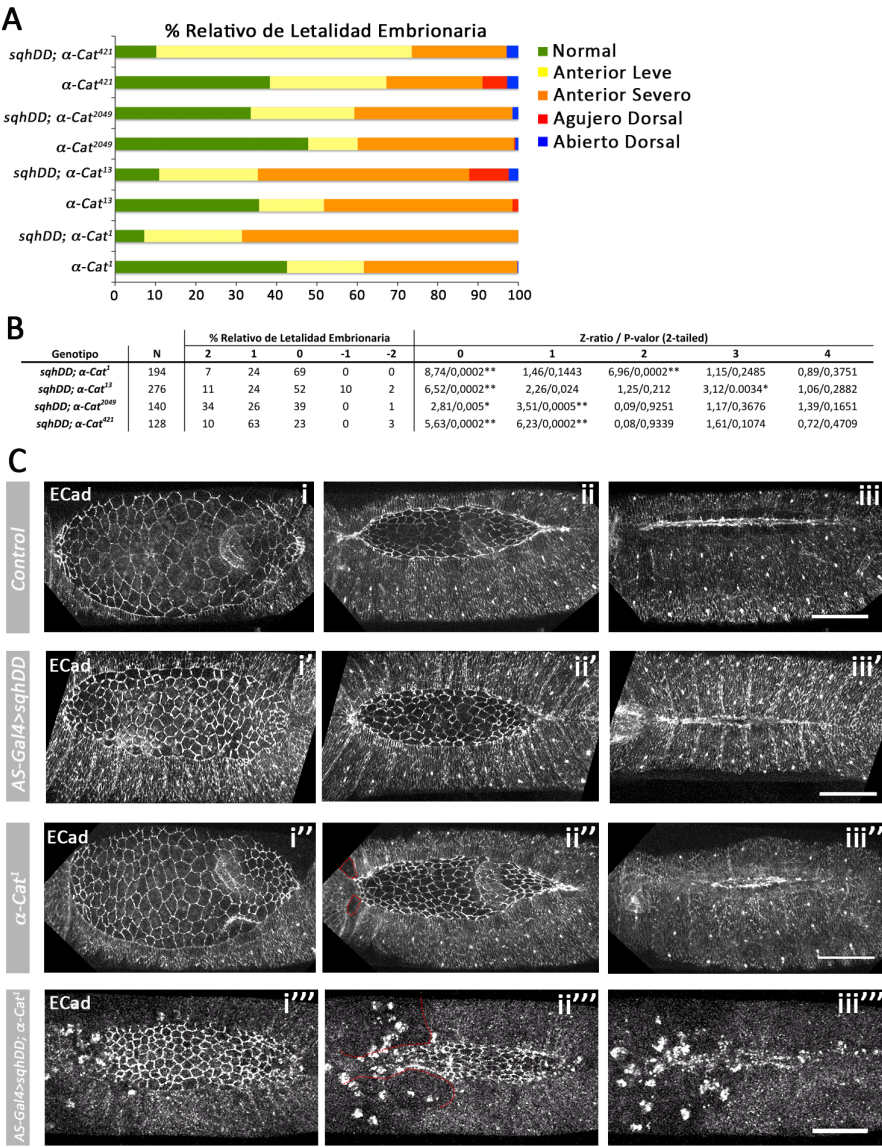


Fig. R12

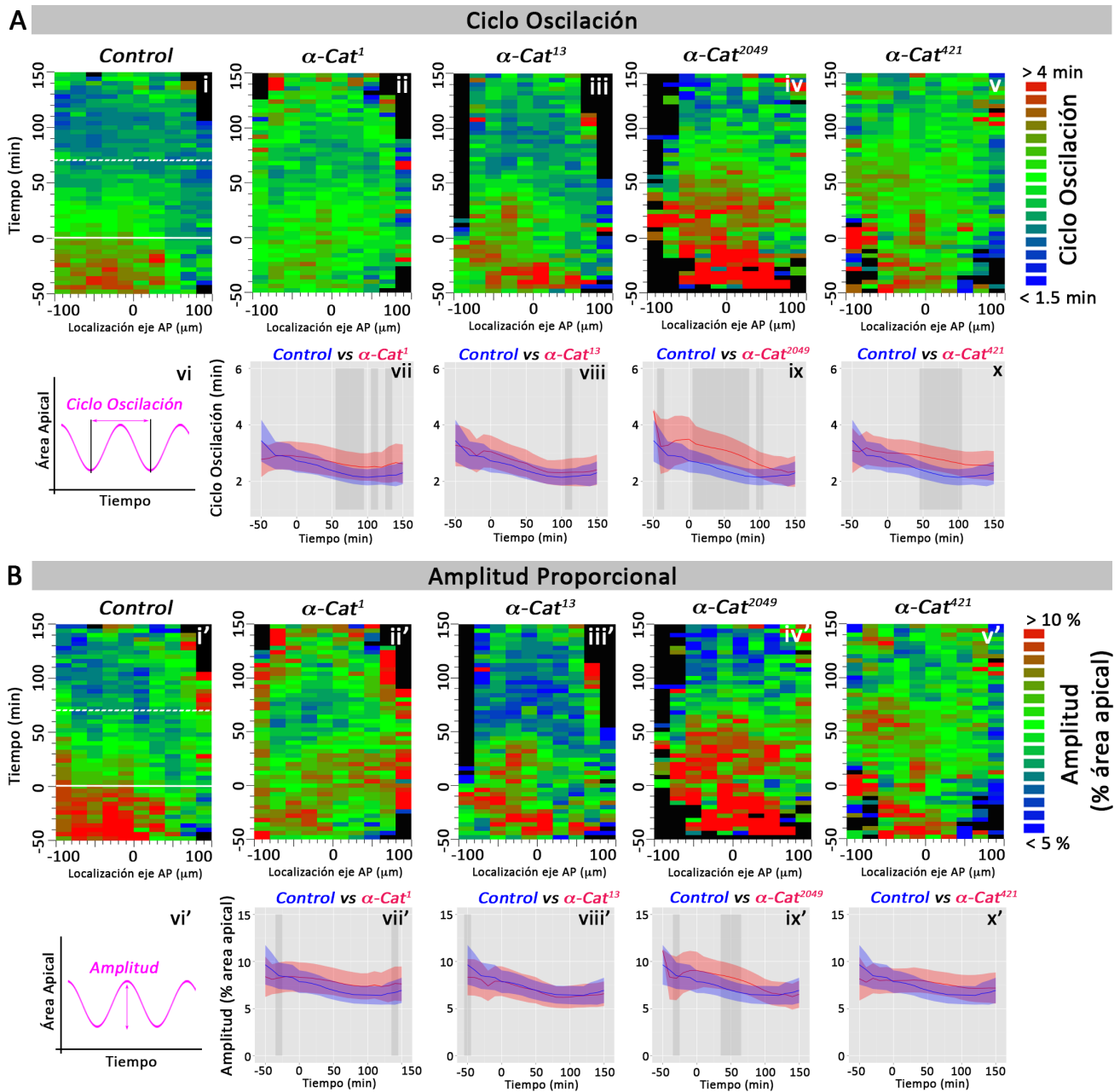


Fig. R13

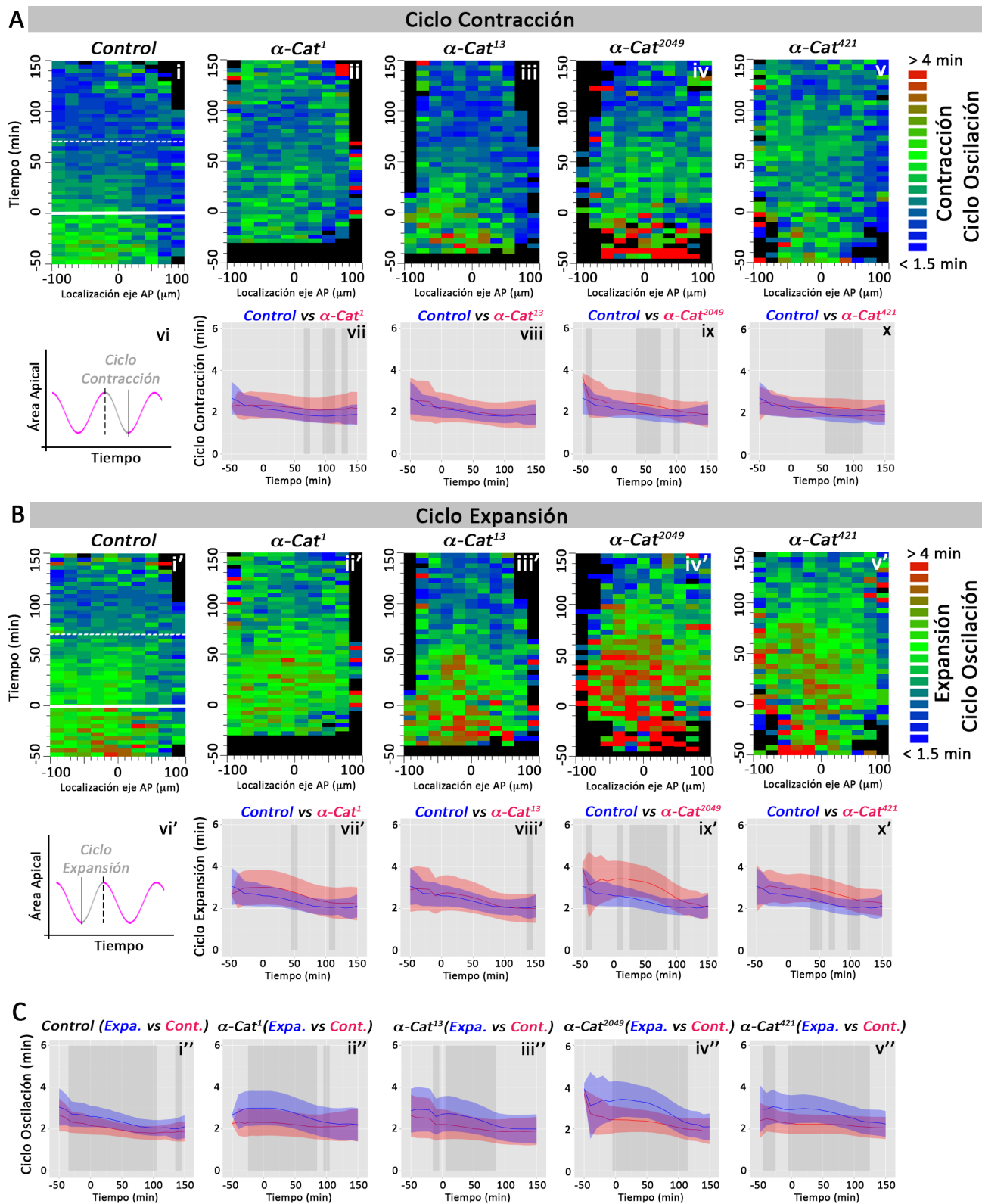


Fig. R14

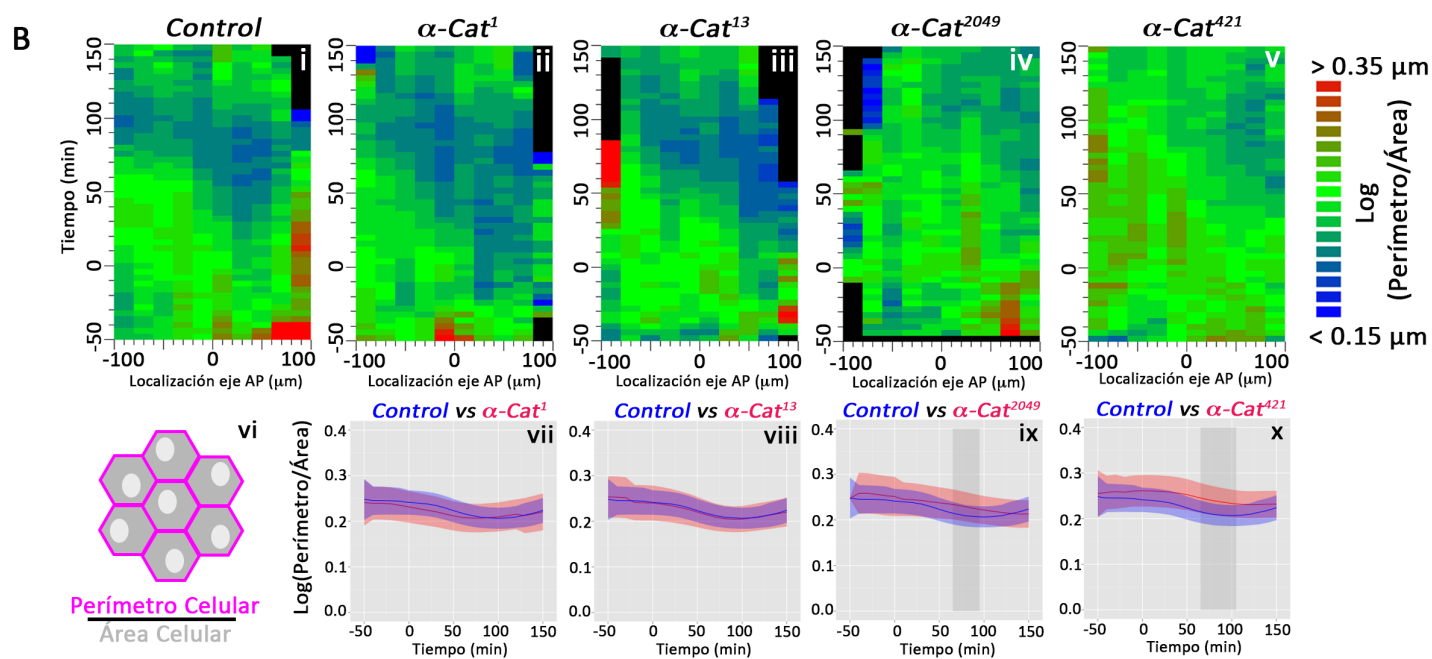
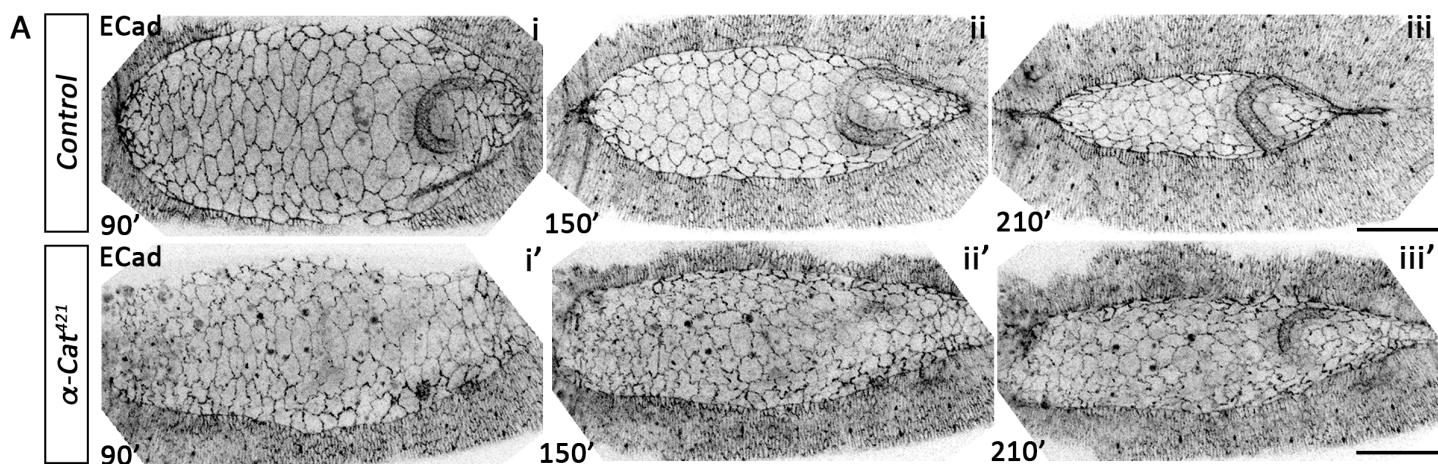


Fig. R15

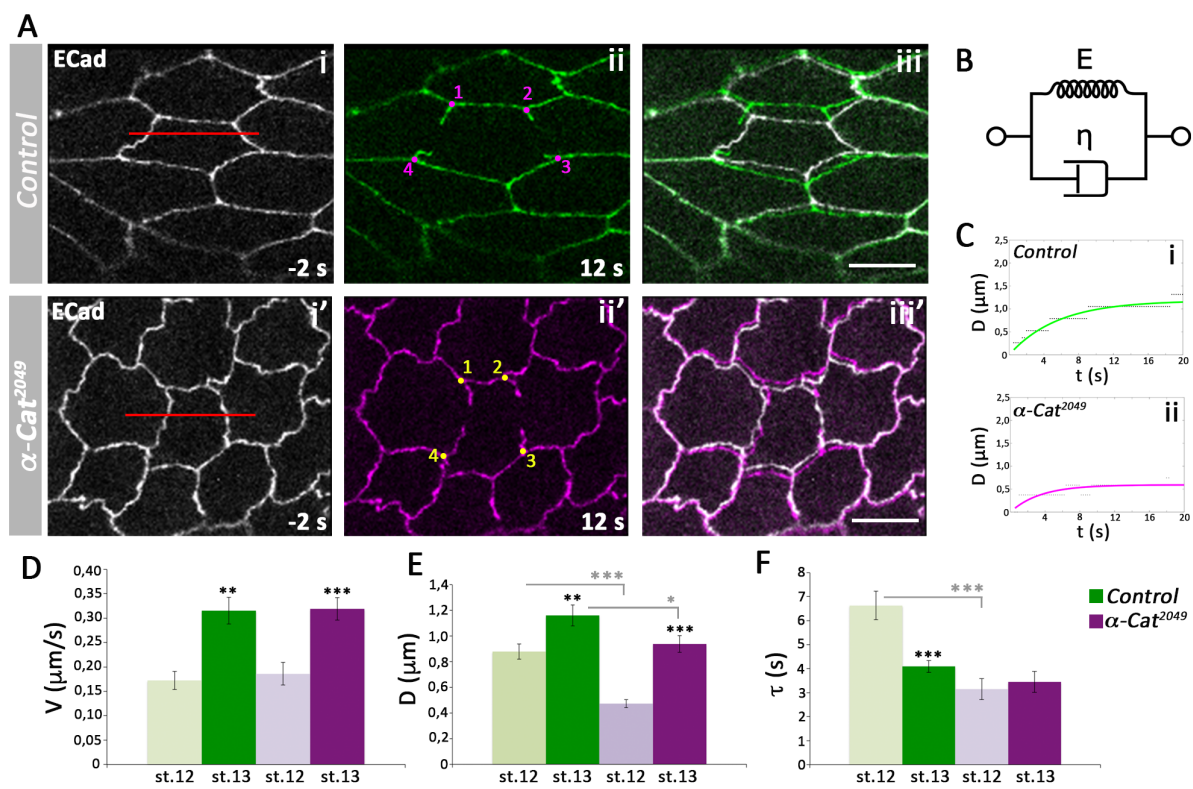


Fig. R16

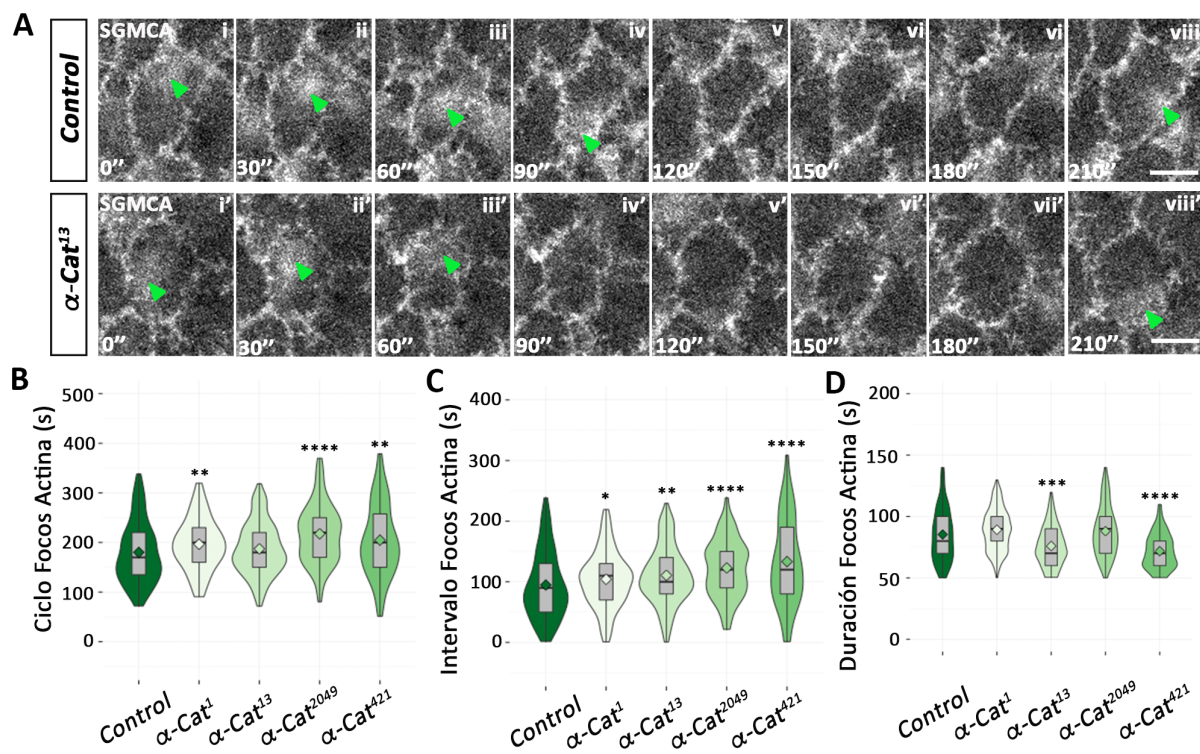


Fig. R17

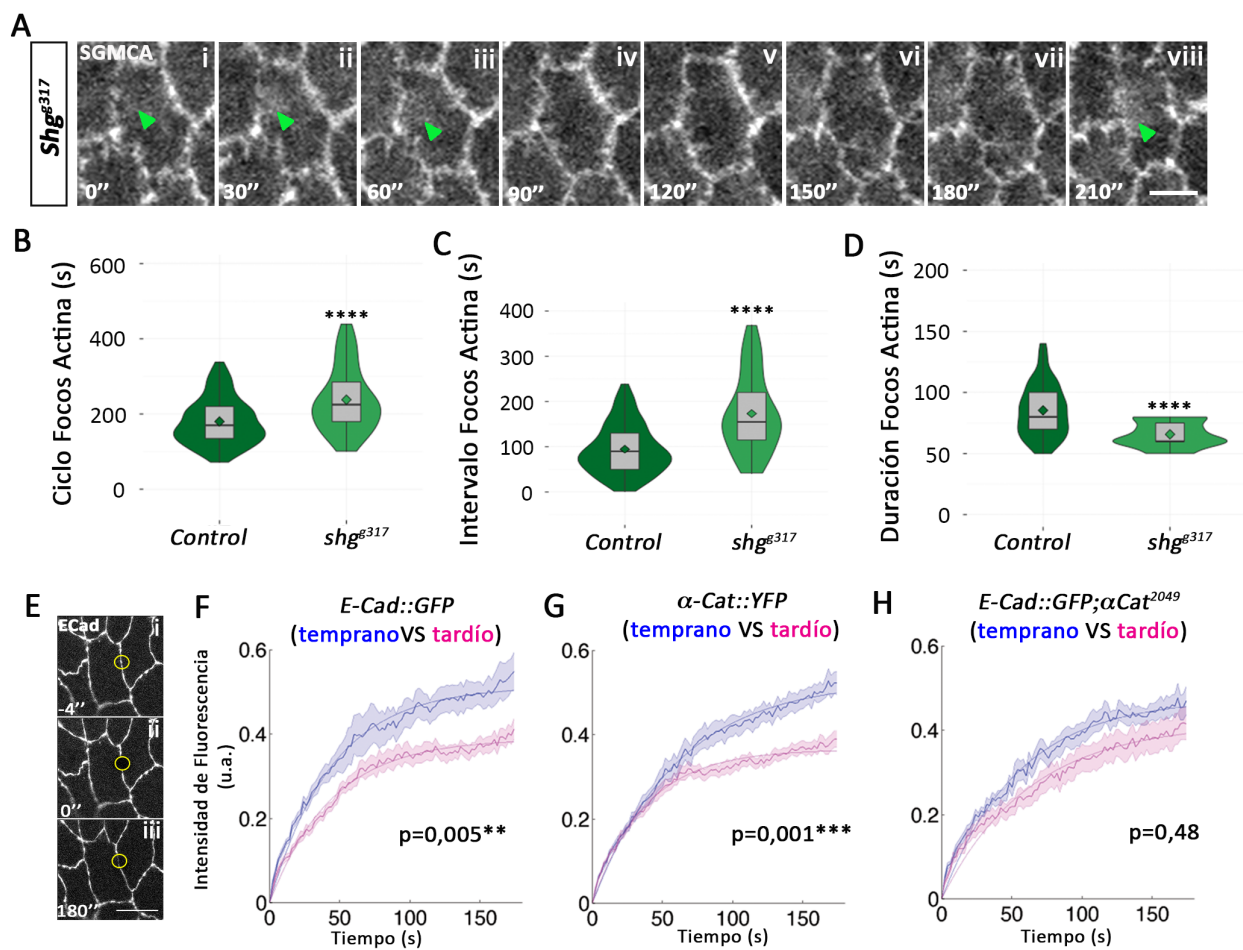


Fig. R18

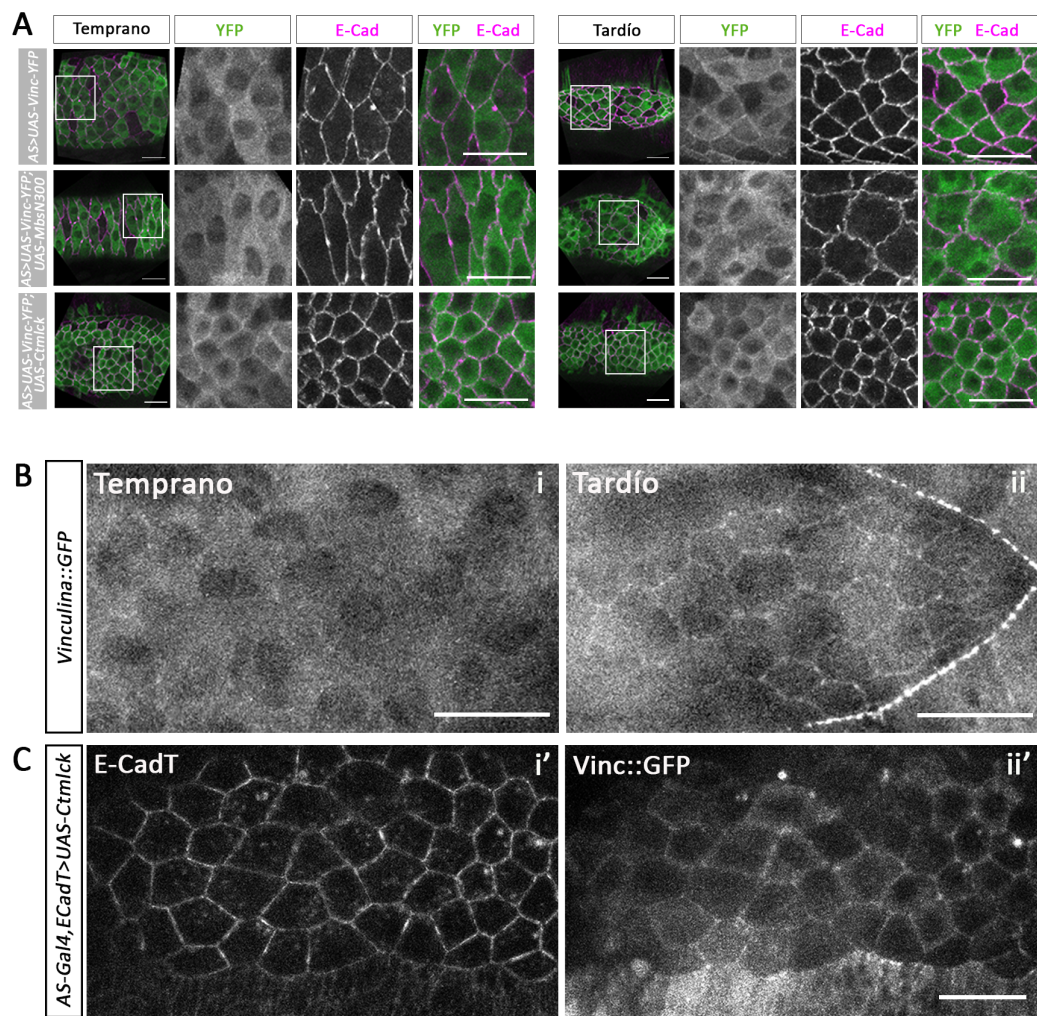
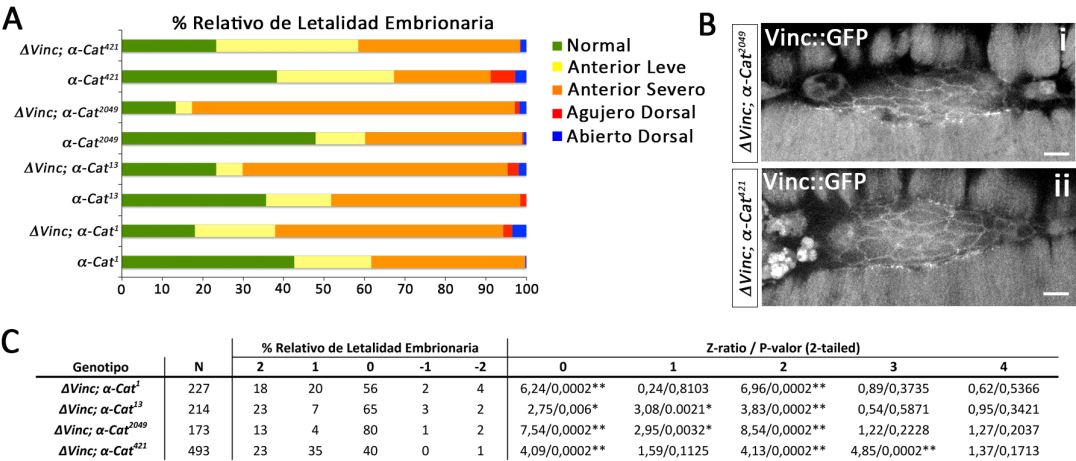


Fig. R19



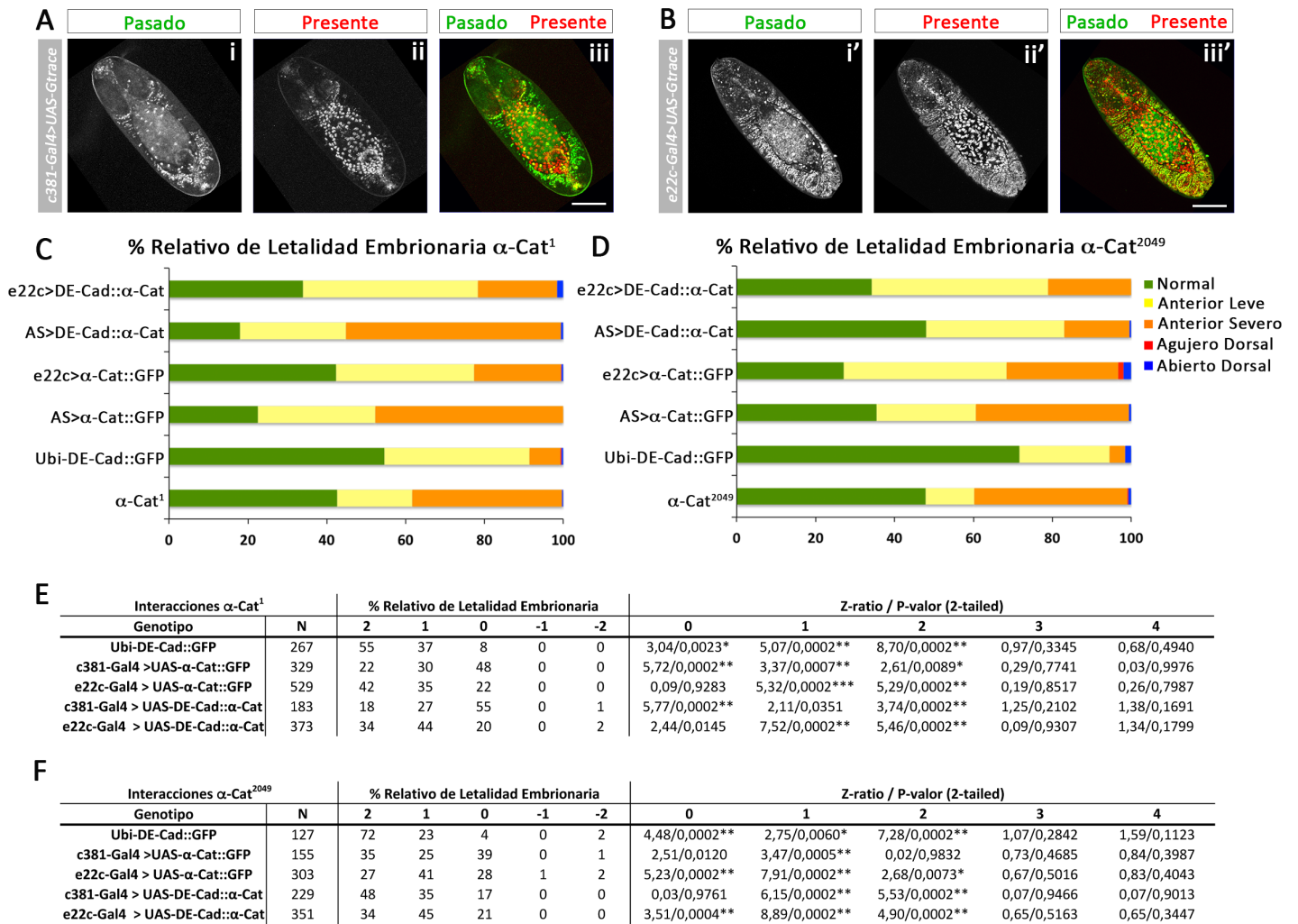


Fig. R21

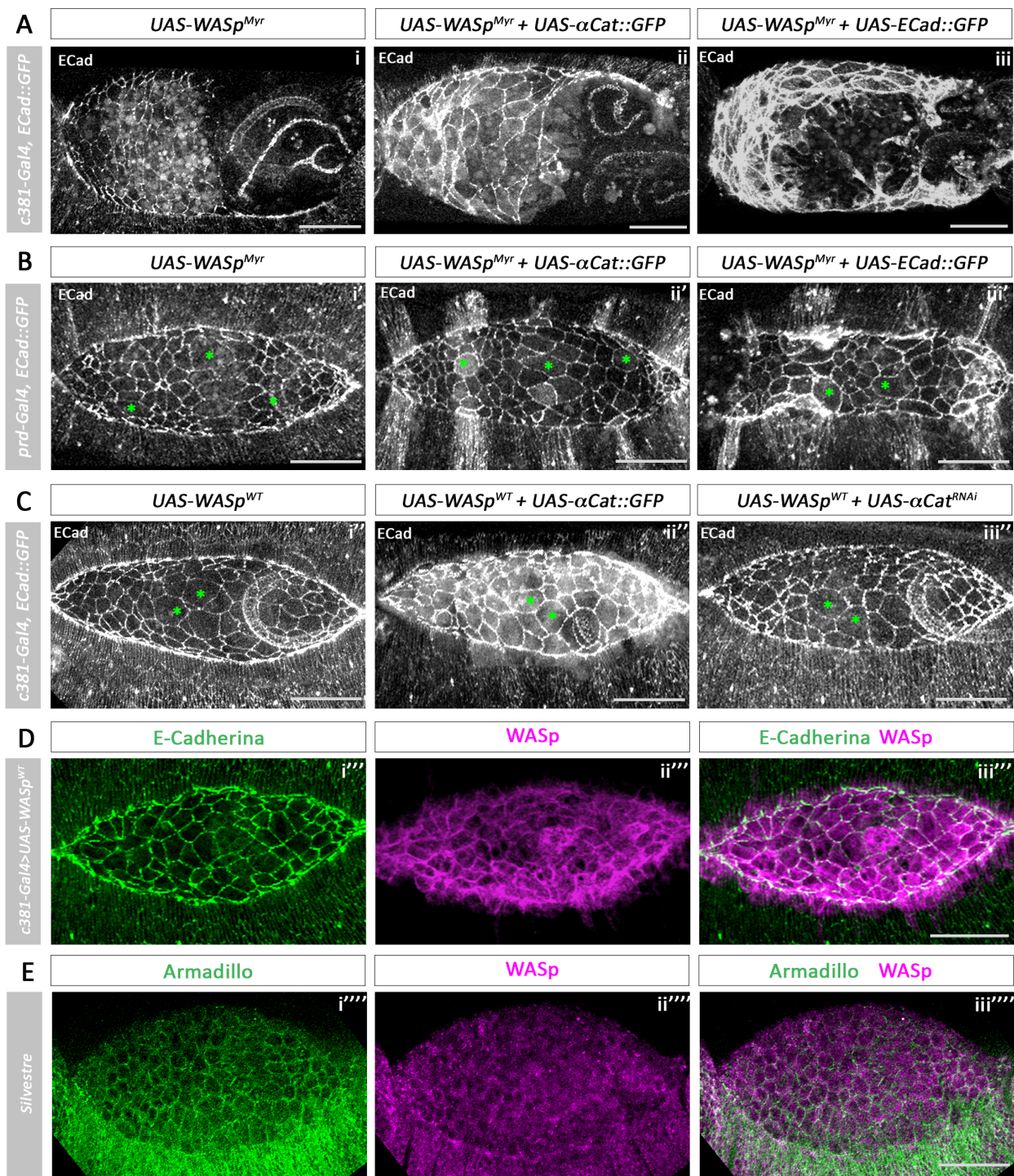


Fig. R22

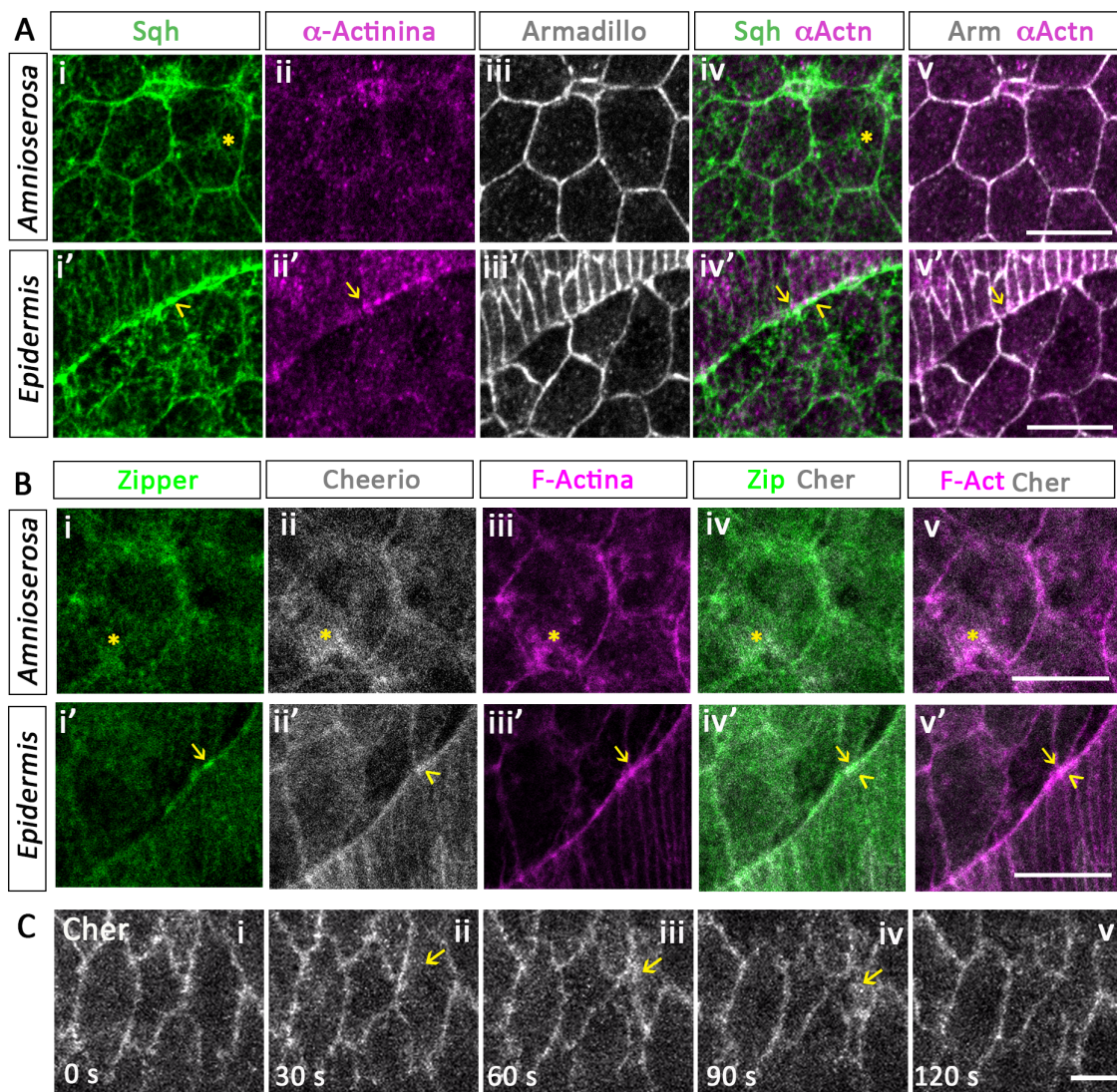


Fig. R23

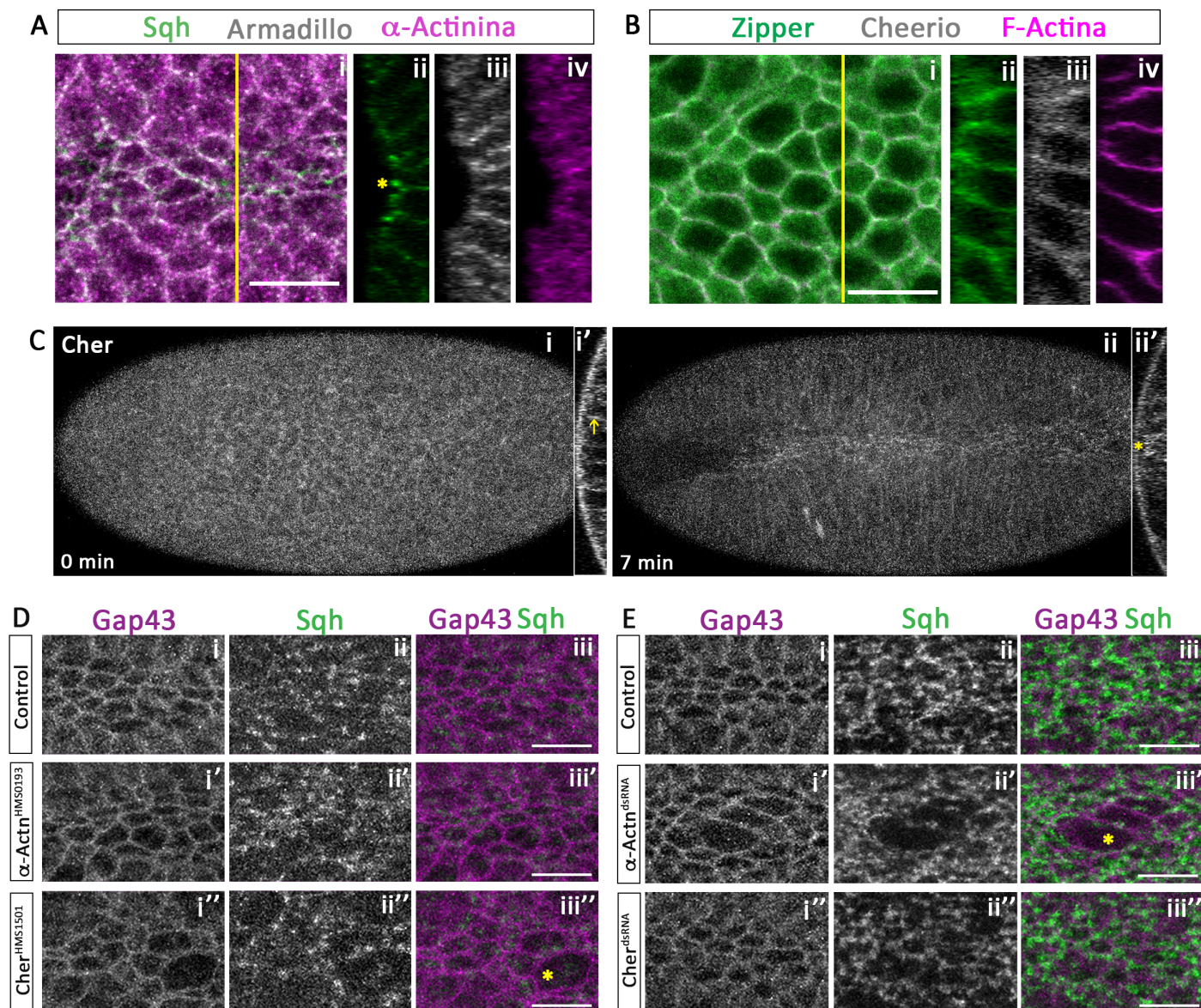


Fig. R24

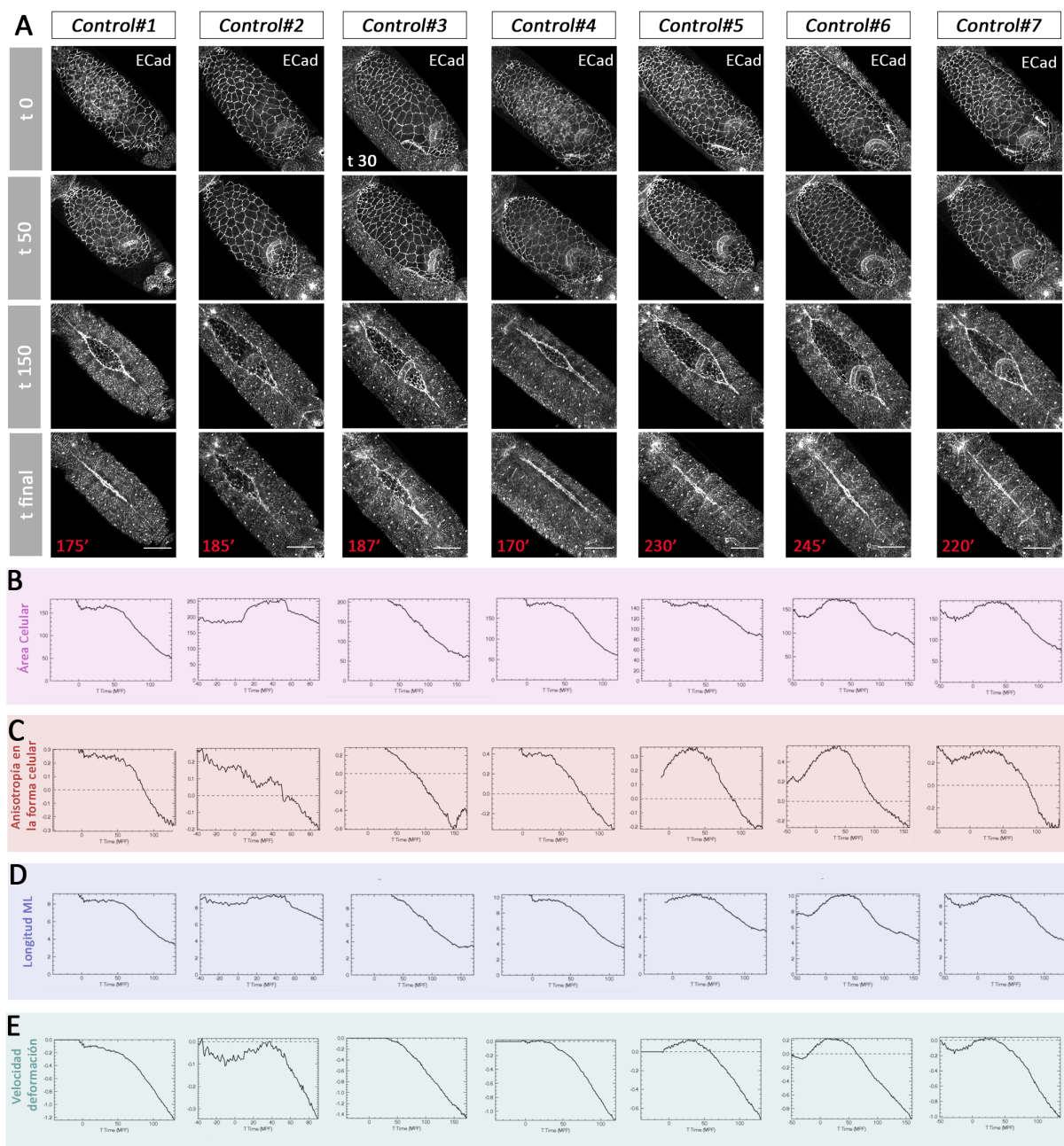


Fig. Sup. 1

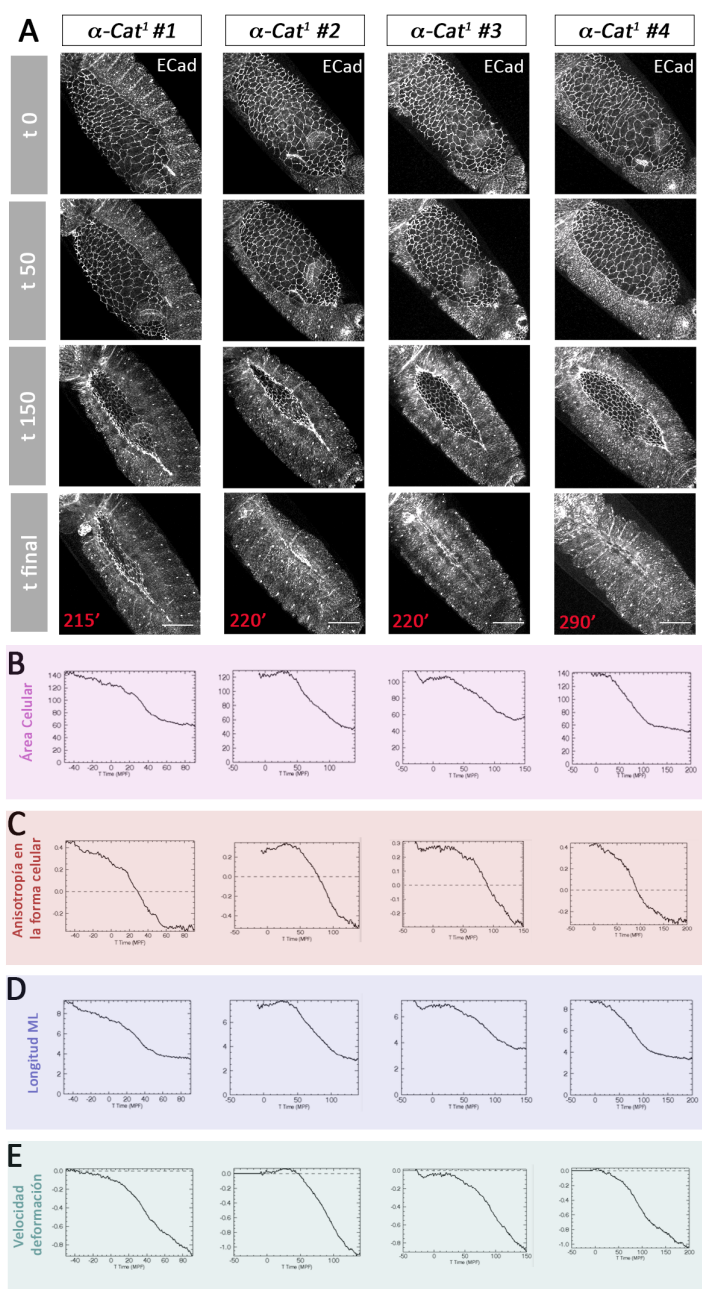


Fig. Sup. 2

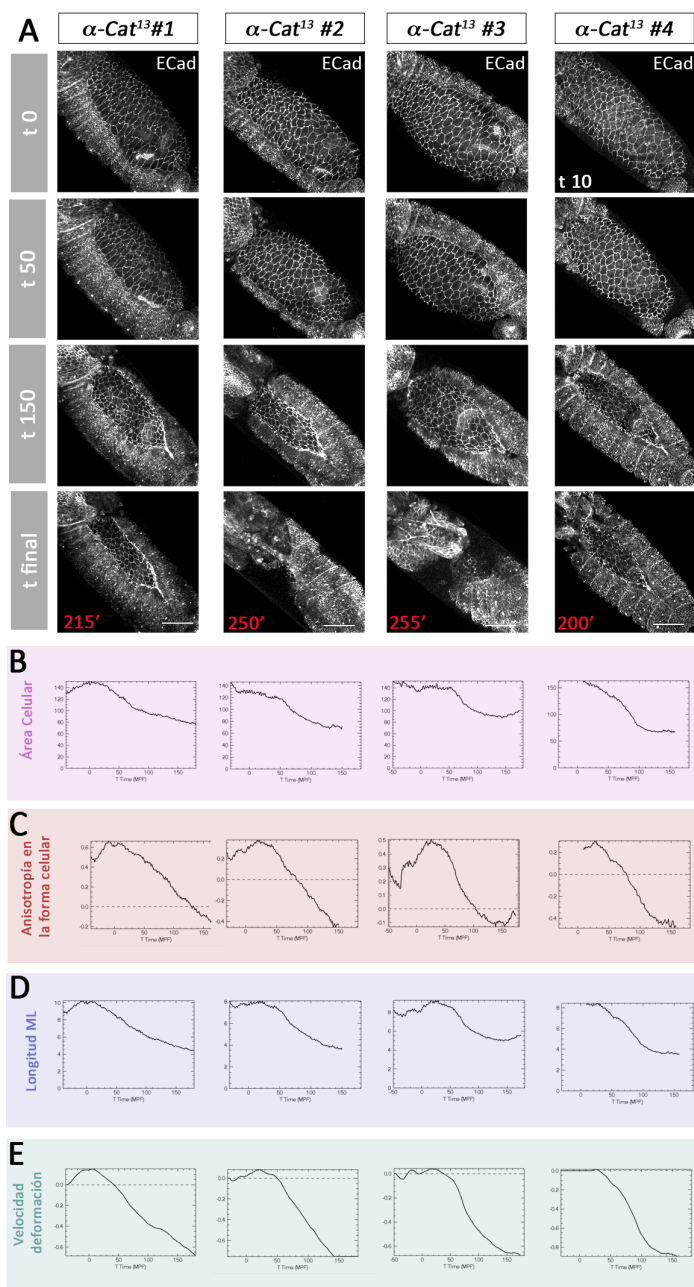


Fig. Sup. 3

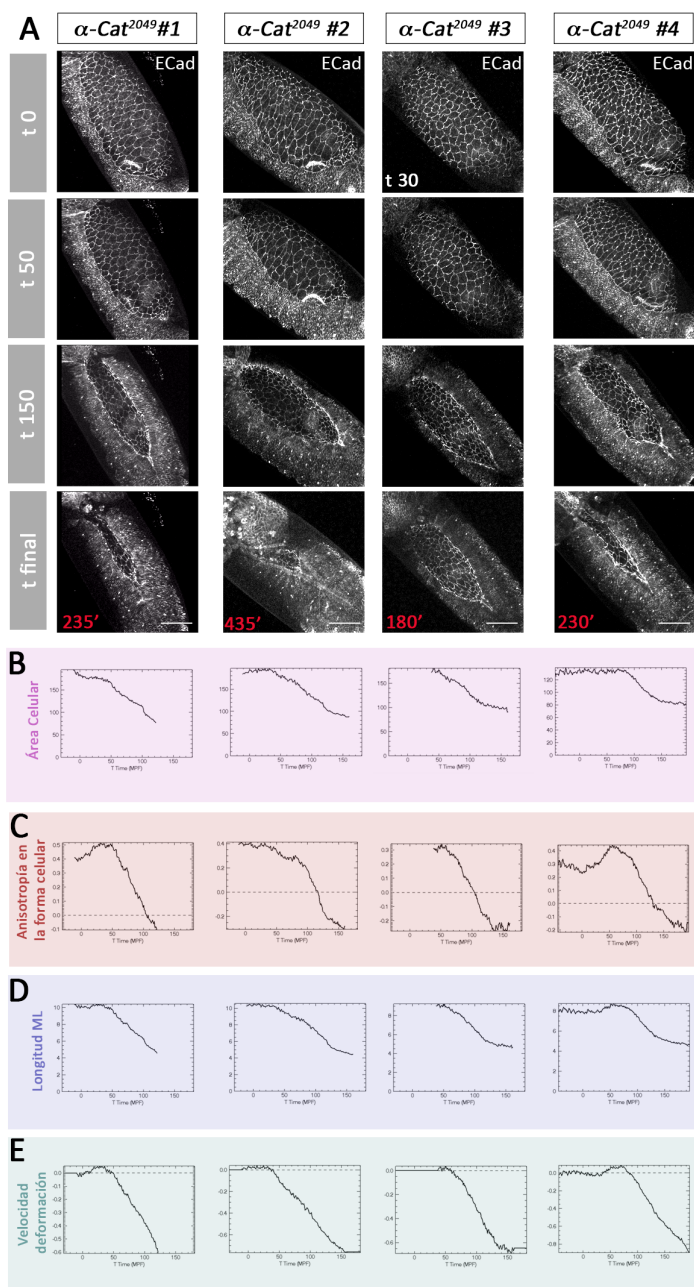


Fig. Sup. 4

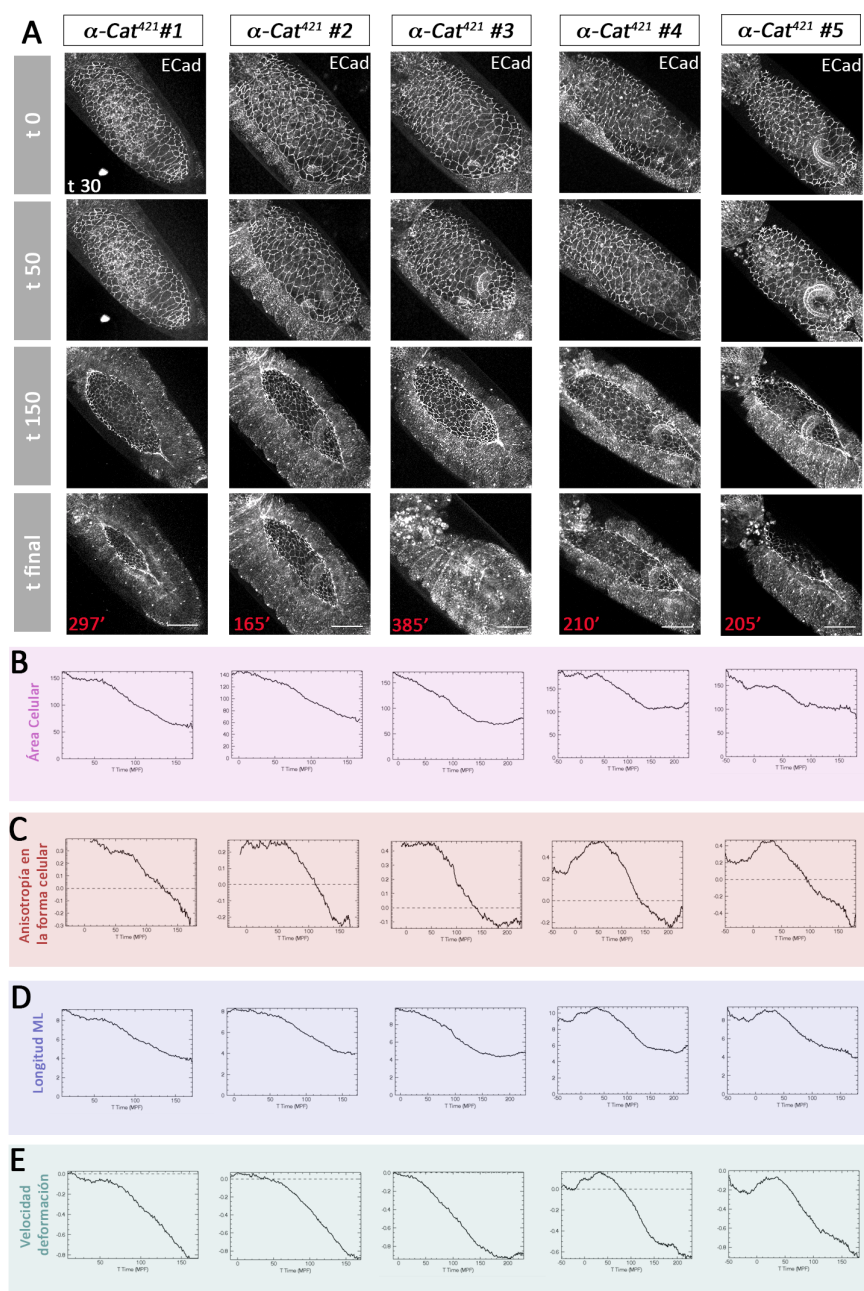


Fig. Sup.5

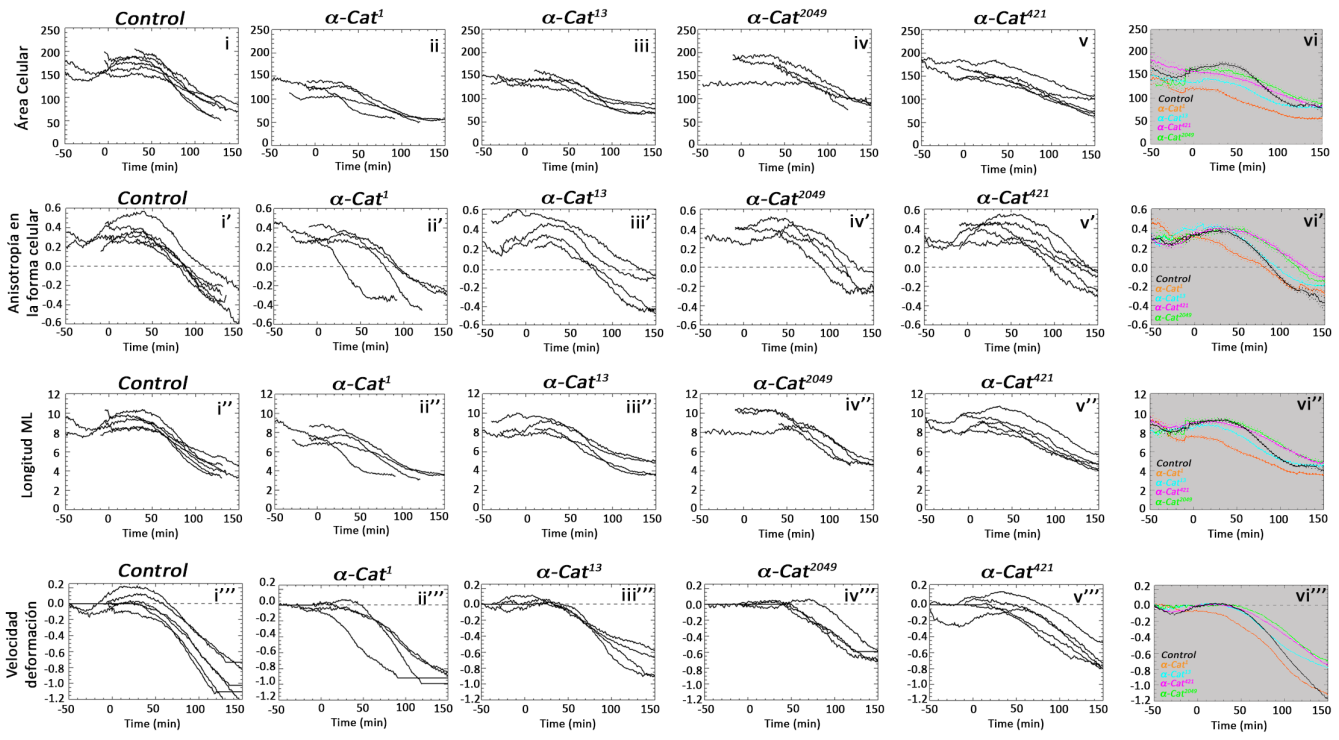


Fig. Sup. 6

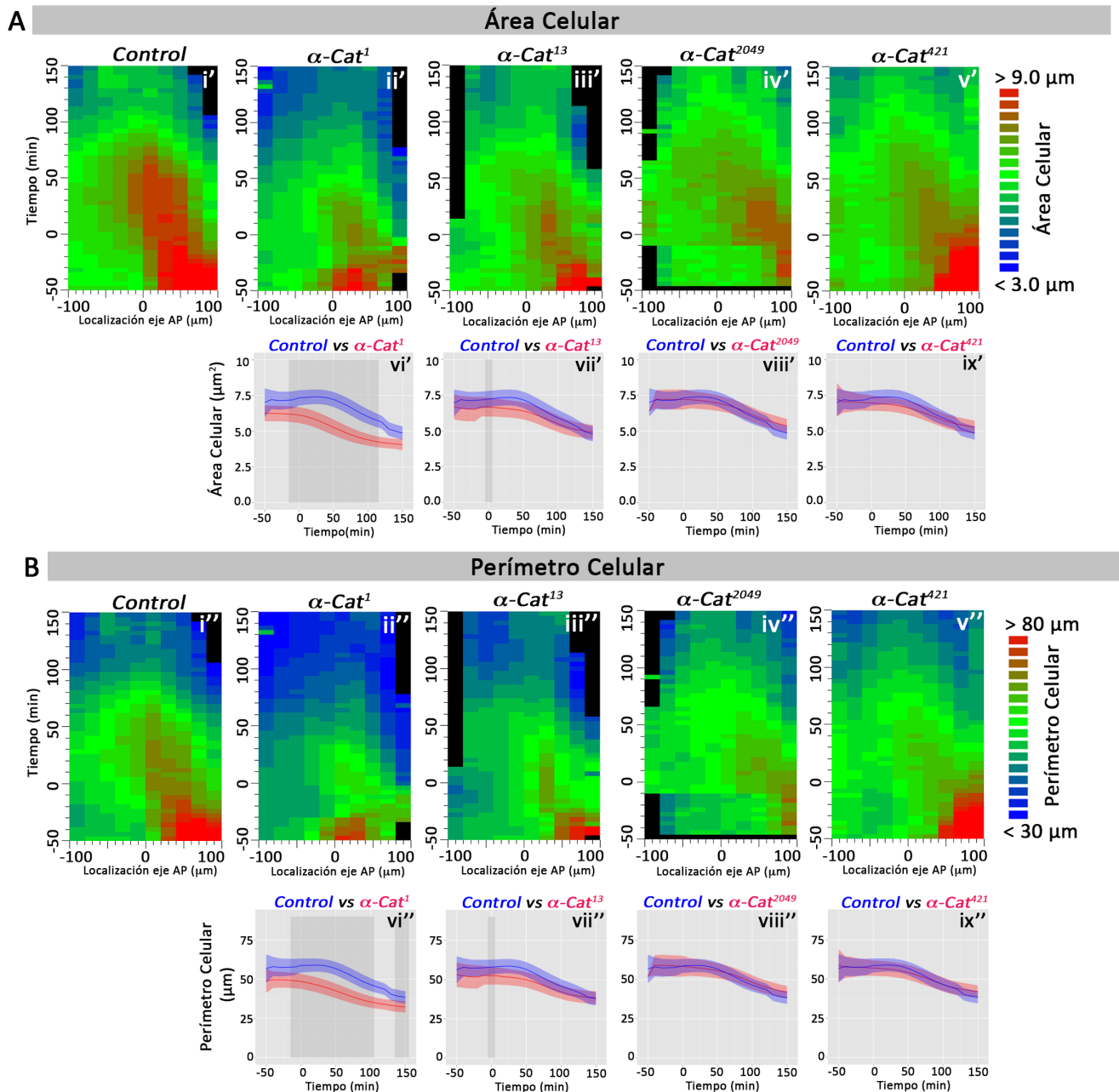
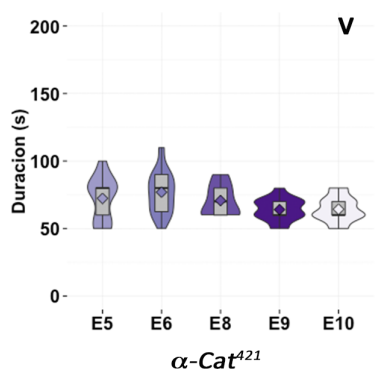
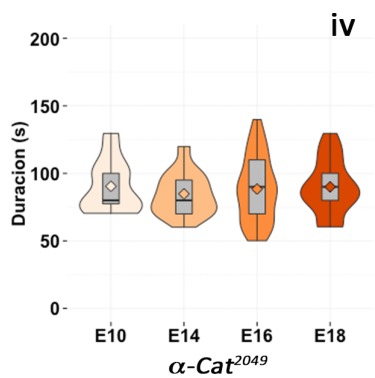
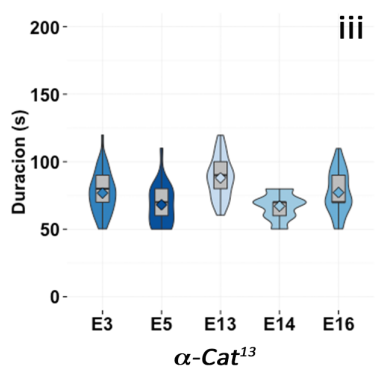
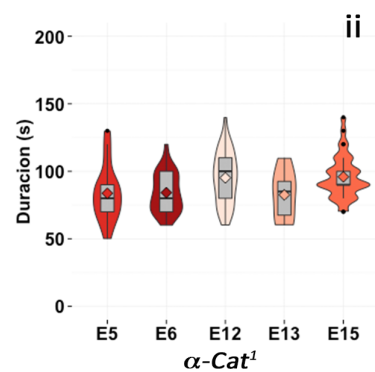
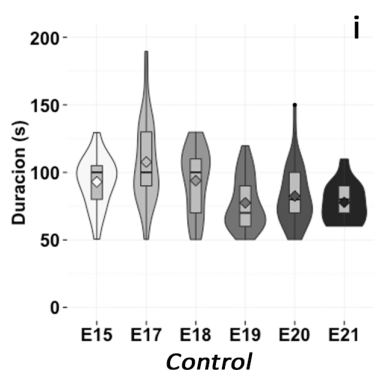


Fig. Sup 7

A Duración Focos Actina



B Intervalo Focos Actina

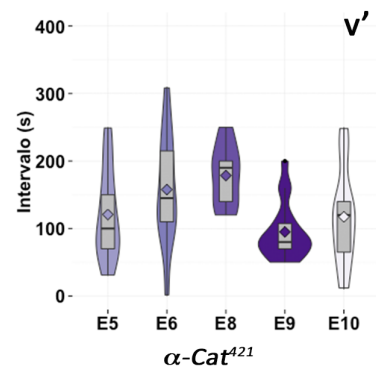
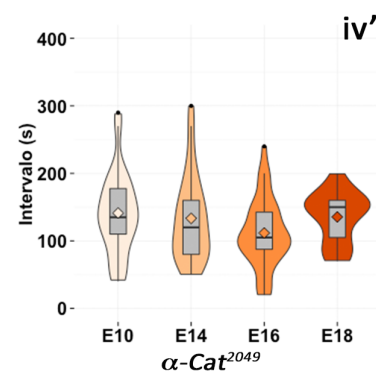
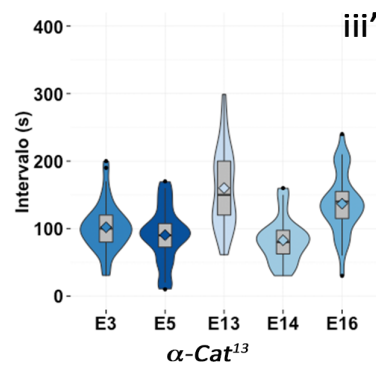
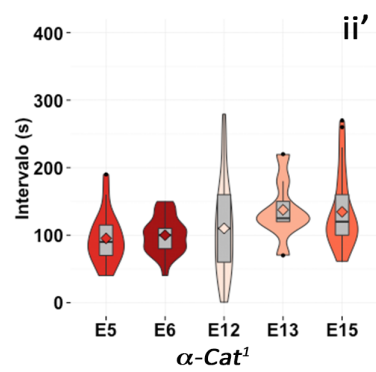
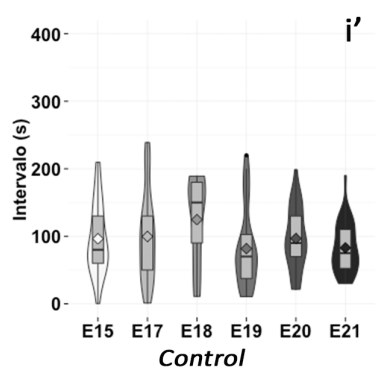


Fig. Sup. 8

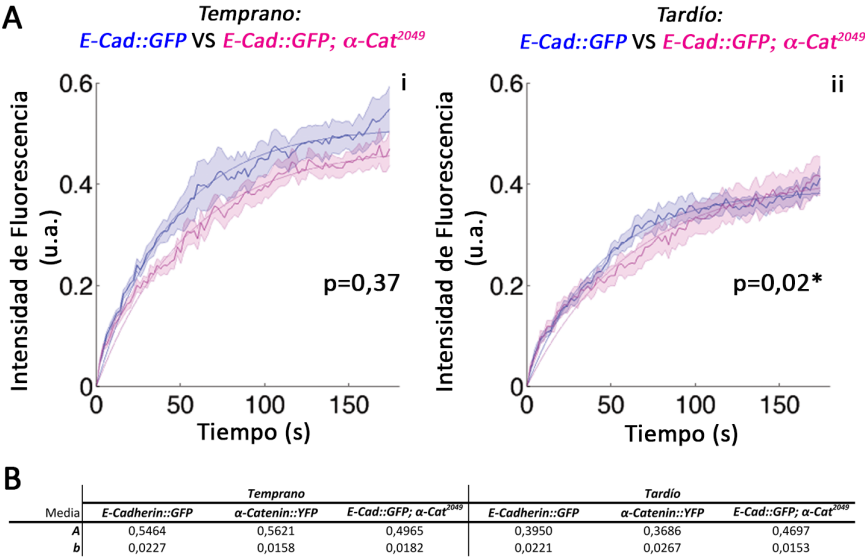


Fig. Sup. 9

Genotipo	#Embriones	#Focos	Focos Actina (media \pm SD) / p-valor (Mann-Whitney Test)		
			Ciclo (s)	Duración (s)	Intervalo (s)
<i>sGMCA</i>	6	118	178,26 \pm 60,94	85,46 \pm 21,36	94,67 \pm 54,65
<i>sGMCA; α-Cat¹</i>	5	143	191,04 \pm 47,47 / 0,0105	88,52 \pm 16,46 / 0,1707	101,43 \pm 42,97 / 0,0455
<i>sGMCA; α-Cat¹³</i>	5	158	185,59 \pm 50,71 / 0,1471	75,95 \pm 16,12 / 0,0003	109,87 \pm 46,35 / 0,0029
<i>sGMCA; α-Cat²⁰⁴⁹</i>	4	112	208,41 \pm 56,77 / 0,0001	88,26 \pm 20,13 / 0,3898	122,80 \pm 46,94 / 0,0001
<i>sGMCA; α-Cat⁴²¹</i>	5	86	204,65 \pm 72,19 / 0,0029	71,74 \pm 14,41 / 0,0001	132,91 \pm 71,62 / 0,0001
<i>sGMCA; Shg^{g317}</i>	4	40	238,06 \pm 85,95 / 0,0001	64,87 \pm 12,33 / 0,0001	173,33 \pm 85,59 / 0,0001

Tabla Sup. 1

